

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA  
DE SOX2 E ALDH1 COMO BIOMARCADORES EM  
PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DO PÊNIS**

**LUIZ RENATO MONTEZ GUIDONI**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Gustavo Cardoso Guimarães**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Guidoni, Luiz Renato Montez

**Estudo da expressão imunohistoquímica de SOX2 e ALDH1 como biomarcadores em pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis /**

Luiz Renato Montez Guidoni - São Paulo, 2019.

124p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Gustavo Cardoso Guimarães

Descritores: 1. Neoplasias Penianas/Penile Neoplasms. 2. Carcinoma de Células Escamosas/Carcinoma, Squamous Cell. 3. Biomarcadores/Biomarkers. 4. Aldeído Desidrogenase/Aldehyde Dehydrogenase. 5. Genes sry/Genes, sry. 6. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry

## **DEDICATÓRIA**

A meus amados pais, Antonio Carlos e Solange, por dedicarem suas vidas aos seus filhos. Além de muito carinho, educação e apoio incondicional, nos transmitiram os preciosos valores através de seus exemplos. É contagiante a alegria dessas duas pessoas maravilhosas a cada conquista de seus filhos!

A Renata, minha alma gêmea, minha esposa, pelo amor, cumplicidade, incentivo e paciência. Sua companhia traz a tranquilidade necessária para encararmos as dificuldades sem perder o sorriso.

Ao meu garotão Enrico, maior presente que Deus me deu, que ilumina a minha vida há 4 anos. Minha maior inspiração e razão de viver.

Aos meus irmãos, Carlinhos e Angélica, pelo amor e carinho ao caçula. Sempre me ensinando com os seus passos.

Aos avós, Inah, Catão (i.m.), Elga (i.m.), Gino (i.m.), pelo carinho recebido desde a infância.

A amiga Luzia, pelo carinho e apoio há mais de 30 anos.

Aos sogros, cunhados e sobrinhos, pela amizade e momentos felizes em família.

A todas as pessoas especiais da minha família que contribuíram nesses 40 anos de vida.

Aos pacientes do Hospital do Câncer e da Santa Casa de São Paulo, pelas várias lições de vida ao longo desses 22 anos de vida médica, além de tornar possível a minha formação médica e o avanço da ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, o criador dessas maravilhas que são os seres humanos e sua biologia perfeita. Ainda nos dá a oportunidade de nascer, crescer, desenvolver várias habilidades, amar e transmitir tudo de diversas formas, inclusive através dessa tese.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, meu orientador e grande incentivador, que tornou possível a minha vinda para esse grupo fantástico de pessoas e pesquisadores no A.C.Camargo Cancer Center para a realização do mestrado em 2010, na qual foi fundamental. Como orientador do doutorado fez a minha admiração e gratidão aumentarem em progressão geométrica, pela amizade, ajuda, ensinamentos, paciência e incentivo desde o início até o final desta realização. Um exemplo a ser seguido!

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, meu co-orientador, pela confiança depositada, dedicação, eficiência e ensinamentos na elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, pela sua amizade, incentivo e apoio em todas as minhas tarefas científicas.

Ao Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center e todos os integrantes, em especial Dr. Walter Henriques da Costa, pela amizade e vasta contribuição na realização dessa tese.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, pela eficiência, dedicação durante toda a vida no estudo do carcinoma peniano no A.C.Camargo Cancer Center e que tornou possível este trabalho.

A Dra. Stephania Bezerra, Diretora do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, pela sua amizade, incentivo e auxílio fundamental na fase final da elaboração dessa tese.

A Dra. Isabela Werneck, pela amizade e auxílio fundamental na realização dos experimentos envolvidos nessa tese.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, excelência em ensino e pesquisa, instituição que prima não apenas pela docência, mas também pelo alto nível das suas publicações internacionais.

Ao Dr. Roni de Carvalho Fernandes, Assistente do Serviço de Urologia da Disciplina de Cirurgia da Santa Casa de São Paulo, pela competência, relação médico-paciente e chefe-residente primorosa e dedicação admirável. Foi fundamental na minha formação médica e urológica, incentivando e apoiando as escolhas na faculdade, residência e pós- residência. Pelo elo com os médicos do Hospital do Câncer que me possibilitaram essa realização.

A Santa Casa de São Paulo, seus professores e preceptores, onde desde 1997, fui calorosamente acolhido, uma escola médica completa, em termos éticos, técnicos e principalmente, sociais. Muito obrigado por me ensinar uma medicina verdadeira, diferente e atualizada.

Aos amigos e companheiros de trabalho, Dr. Ravenda Ryan Moniz, Dr. Artur Ramos Moreno, Dr. Felipe Augusto da Silva Bertagnon, Dr. Raphael de Jesus Moreira, Dr. Filipe Alvarez S. C. Correia, Dr. Fernando Rios, Dr. Alexandre Sato, Jacqueline Cuccolo, Ludmila Jorge e Daniela Samaritano pela amizade, incentivo e apoio.

Aos amigos companheiros de faculdade e residência, Dr. Pedro Varella, Dr. Rodrigo Contrera do Rio, Dr. Sérgio Yoda Horita, Dr. Andreas Koszka, Dr. Caio Aquino, Dr. Álvaro Pentagna, Dra. Thais Helena Matsuda, Dr. Daniel Hideo, Dra. Luciana

Digieri, pela amizade permanente mesmo após tantos anos de término da faculdade / residência.

Aos amigos e colegas da residência de urologia, Dr. Antonio João de Aquino, Dr. Walter Henriques, Dr. Gilvan Ferreira, Dr. Fernando Korkes, Dr. Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto, Dr. Ravenda Ryan Moniz, Dr. André Costa Mattos, Dr. Rafael Radaelli, Dr. Hallison Costa, Dr. Mauricio Akira, Dr. Rui Wanderley Mascarenhas pela ajuda, apoio e amizade.

Ao Dr. André Ibrahim David e sua esposa Milene Cury, pela amizade, carinho e por me “adotarem” desde o início da formação médica.

Aos amigos e colegas, Dr. Moacyr Fucs, Dr. Silvio da Ressureição Pires, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Cristian Fuhro, Dr. Celso de Oliveira, Dr. Ricardo Léo Roberto Felts De La Roca, Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Alex Menezes, Dr. Júlio Máximo, Dr. Marcos Bróglia, Dr. Rodrigo Wilson, Dra. Isabel Cristina de Albuquerque Feitosa, Dr. Gustavo Cuck, Dr. Luis Gustavo de Morato Toledo, Dr. Adalberto Andriolo Junior, pelos ensinamentos fundamentais à minha formação e pelo apoio.

Aos Professores Dr. Luiz Arnaldo Szutan e Dr. Miguel Russo Jr., pela amizade e todos os ensinamentos que colaboraram muito em minha formação.

Ao colega e amigo Dr. Hamilton Brasil, pela amizade e confiança.

Aos companheiros e funcionários do Hospital Geral de Guarulhos e do Hospital São Luiz, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos grandes velhos amigos Dr. Marcello Souza Silva, Dr. Leonardo del Grande, Dr. Mauro Penteado, Dr. Tadeu Colens Ourivio e Dr. Fernando Conde pela amizade e momentos inesquecíveis.

Ao laboratório de patologia do A.C.Camargo Cancer Center e todos os colaboradores, pela amizade e fundamental ajuda na realização desse trabalho.

A Sra. Thais Safranov, pela colaboração, dedicação primorosa e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do A.C.Camargo Cancer Center, pelas sugestões, orientações e revisão desta dissertação. Pela simpatia e atenção que exaltam ainda mais as suas qualidades.

A biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center e todos os funcionários, pela incansável busca pelos artigos mais difíceis, de forma eficiente e amigável.

A Sra. Karla Cristina Brito de Barros, Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Ana Maria Kunari da pós-graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pelo cuidado, organização e competência.

## RESUMO

Guidoni LRM. **Estudo da expressão imunohistoquímica de SOX2 e ALDH1 como biomarcadores em pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O câncer de pênis pode chegar, em alguns países em desenvolvimento, até a 20% das neoplasias no homem. O tratamento padrão é a amputação do tumor primário e na linfadenectomia regional. A baixa acurácia dos métodos de estadiamento da doença linfonodal, que no momento é o fator prognóstico mais importante e a alta taxa de morbidade da linfadenectomia tem estimulado o estudo de novos fatores prognósticos preditivos de metástases em linfonodos, facilitando a seleção de pacientes a serem submetidos à linfadenectomia. Foram escolhidos SOX2 e ALDH1 por terem sido bons resultados preditivos em outros CEC, mas sem estudos em tecido peniano

**Objetivos:** O presente estudo visa estudar a expressão imunohistoquímica de SOX 2 e ALDH1 no carcinoma peniano, além de identificar o valor prognóstico dessa expressão correlacionando-a com o tumor primário no risco de metástase linfonodal e a relação destes com as variáveis clínicas, demográficas e anatomopatológicas, bem como sua relação com sobrevida livre de doença e global.

**População e Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente 203 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide do pênis submetidos ao tratamento do tumor primário e a linfadenectomia radical ou aqueles submetidos ao tratamento do tumor primário, não linfadenectomizados, com pelo menos cinco anos de seguimento, utilizando a imunohistoquímica para analisar os marcadores.

**Resultados:** A expressão de SOX2 esteve associada inversa e significativamente com o padrão de crescimento vertical e infiltração de corpo esponjoso e uretra, porém sem relação com sobrevida global ou câncer específica. O biomarcador ALDH1 reagiu apenas com 2% da amostra, o que fez com que não pudéssemos avaliá-lo satisfatoriamente. Quando analisado metástase linfonodal, não houve diferença significativa com a expressão nenhum dos marcadores. A infiltração perineural, metástase linfonodal, estadiamento pT foram os fatores independentes de pior sobrevida global

**Conclusão:** SOX2,

apesar de presente no carcinoma peniano, não se relacionou com metástase linfonodal ou sobrevida. ALDH1 não parece ser considerável em carcinoma peniano.

**Descritores:** Neoplasias Penianas. Carcinoma de Células Escamosas. Biomarcadores. Aldeído Desidrogenase. Genes sry. Imuno-Histoquímica

## SUMMARY

Guidoni LRM. [**Immunohistochemical expression of sox2 and aldh1 as biomarkers in patients with penile squamous cell carcinoma**]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** In some developing countries, up to 20% of all neoplasia in males is due to penile cancer. The standard treatment is primary tumor amputation and regional lymphadenectomy. The poor accuracy of lymph node staging methods, currently the most important prognostic factor and the high morbidity rate of lymphadenectomy, stimulated the study of new prognostic factors that predict lymph node metastases, facilitating the selection of patients for lymphadenectomy. SOX2 and ALDH1 were selected because they presented good predictive results in other squamous cell carcinomas, but studies on penile tissue were not available. **Objectives:** To study the immunohistochemical expression of SOX 2 and ALDH1 in penile carcinoma, as well as identify the prognostic value of this expression, correlate it with the primary tumor regarding risk of lymph node metastasis and the relationship with clinical, demographic and anatomopathological variables as well as disease-free and overall survival. **Methods:** 203 patients diagnosed with penile squamous cell carcinoma who underwent primary tumor treatment and radical lymphadenectomy or primary tumor treatment without lymphadenectomy with at least five years of follow-up were assessed using immunohistochemistry to analyze the markers. **Results:** The SOX2 expression was inversely and significantly related to the vertical growth pattern and the infiltration of the corpus spongiosum and urethra but without any relationship to overall or specific cancer survival. The biomarker ALDH1 only reacted with 2% of the samples, which meant it could not be satisfactorily evaluated. None of the markers presented a significant difference regarding lymph node metastasis. Perineural infiltration, lymph node metastasis, and staging pT were independent factors of poor overall survival. **Conclusion:** Although SOX2 is present in penile carcinoma, it is not related to lymph node metastasis or

survival. ALDH1 does not appear to have a considerable presence in penile carcinoma.

**Key words:** Penile Neoplasms. Carcinoma, Squamous Cell. Biomarkers. Aldehyde Dehydrogenase. Immunohistochemistry

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Modelo esquemático das funções das ESC, entre elas SOX2. ....	24
<b>Figura 2</b>	Desenvolvimento embrionário com identificação de momento chave da presença de SOX2 e Oct4 .....	26
<b>Figura 3</b>	Modelo esquemático das funções de ALDH1 .....	30
<b>Figura 4</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para SOX2 .....	44
<b>Figura 5</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (1-25%) para SOX2.....	44
<b>Figura 6</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (26 a 50%) para sox2.....	45
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (51 a 75%) para SOX2 .....	45
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (acima de 75%) para SOX2.....	46
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para ALDH1 .....	47

<b>Figura 10</b>	Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para ALDH1 .....	48
<b>Figura 11</b>	Curva de sobrevida câncer específica para os 203 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis .....	71
<b>Figura 12</b>	Curva de sobrevida global para os 203 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis .....	76

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Lesões penianas relacionadas com carcinoma peniano.....	5
<b>Quadro 2</b>	TNM - Estadiamento TNM (2009) .....	11
<b>Quadro 3</b>	TNM – Classificação anatomia patológica TNM (2009).....	12
<b>Quadro 4</b>	Expressão de SOX2 e prognóstico dos pacientes em diferentes tipos de neoplasias.....	27
<b>Quadro 5</b>	Expressão de ALDH1 e prognóstico dos pacientes em diferentes tipos de neoplasias.....	32
<b>Quadro 6</b>	Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Divisão de casos de acordo com a quantificação de marcação de SOX2 .....	46
<b>Tabela 2</b>	Frequência das variáveis demográficas e clínicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano. ....	50
<b>Tabela 3</b>	Distribuição da casuística de acordo com estadiamento clínico clínicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	51
<b>Tabela 4</b>	Distribuição da casuística de acordo com variáveis de esvaziamento ganglionar dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano .....	52
<b>Tabela 5</b>	Distribuição da casuística de acordo com avaliação linfonodal dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano .....	53
<b>Tabela 6</b>	Distribuição da casuística de acordo com variáveis anatomopatológicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	54
<b>Tabela 7</b>	Situação clínica dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.....	56

<b>Tabela 8</b>	Frequência das variáveis demográficas e clínicas com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	60
<b>Tabela 9</b>	Frequência das variáveis estadiamento clínico e cirurgia do tumor primário com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	61
<b>Tabela 10</b>	Frequência das variáveis anatomopatológicas com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	62
<b>Tabela 11</b>	Distribuição da casuística de acordo esvaziamento linfonodal com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	63
<b>Tabela 12</b>	Situação clínica com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) ao final da atualização dos dados .....	64
<b>Tabela 13</b>	Imunorreatividade de SOX2 segundo variáveis clinico-demográficas em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	65
<b>Tabela 14</b>	Imunorreatividade de SOX2 segundo variáveis anatomopatológicas em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	66
<b>Tabela 15</b>	Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano .....	67

<b>Tabela 16</b>	Distribuição da casuística de acordo com linfonodos positivos (não/sim).....	68
<b>Tabela 17</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada	70
<b>Tabela 18</b>	Estimativa dos possíveis fatores de risco independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão logística para ocorrência de linfonodos positivos.....	70
<b>Tabela 19</b>	Probabilidade de Sobrevida Doença Específica de acordo com variáveis demográficas, clínicas e de estadiamento em 203 pacientes com carcinoma peniano .....	72
<b>Tabela 20</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 e 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunexpressão de SOX2 e ALDH1 em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano .....	73
<b>Tabela 21</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada	75
<b>Tabela 22</b>	Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX para Óbito Específico Câncer .....	75

<b>Tabela 23</b>	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano .....	77
<b>Tabela 24</b>	Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 e 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.....	78
<b>Tabela 25</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada..	80
<b>Tabela 26</b>	Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX para qualquer Óbito .....	81

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ALDH1</b>	Aldeído desidrogenase tipo 1
<b>CEC</b>	Carcinoma Espinocelular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ESC</b>	Célula tronco embrionária
<b>HE</b>	hematoxilina-eosina
<b>HIV/AIDS</b>	Vírus da imunodeficiência humana / Síndrome imunodeficiência adquirida
<b>HPV</b>	Papiloma Vírus Humano
<b>ICM</b>	Massa celular interna (do blastocisto)
<b>iPS</b>	Célula tronco pluripotente induzida
<b>LS</b>	Linfonodo Sentinela
<b>mESC</b>	Célula tronco embrionária de rato
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PET-CT</b>	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNM</b>	Ressonância nuclear magnética
<b>SEER</b>	Database: Surveillance, Epidemiology and End Results Database – Banco de dados norte americano de casos de câncer.
<b>SOX2</b>	Abreviatura de SRY box, que significa região determinante do sexo Y tipo 2.
<b>TMA</b>	<i>Tissue microarray</i>
<b>TNM</b>	Estadio do tumor primário (T), presença de linfonodos positivos (N) e metástase (M)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia do Câncer de Pênis .....	1
1.2	Etiologia do Câncer de Pênis .....	2
1.3	Aspectos Clínicos do Câncer de Pênis.....	5
1.4	Diagnóstico do Câncer de Pênis e Avaliação Linfonodal.....	7
1.5	Estadiamento do Câncer de Pênis .....	9
1.6	Aspectos Terapêuticos do Câncer de Pênis.....	13
1.7	Fatores Prognósticos do Câncer de Pênis .....	16
1.8	Células Tronco Tumorais.....	21
1.9	SOX2.....	23
1.9.1	Definição SOX2.....	23
1.9.2	SOX2 e Câncer.....	26
1.10	ALDH1.....	29
1.10.1	Definição ALDH1 .....	29
1.10.2	ALDH1 e Câncer .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>POPULAÇÃO E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1	População de Estudo .....	34
3.1.1	Crítérios de Inclusão .....	34
3.1.2	Crítérios de Exclusão .....	35
3.2	Metodologia .....	35
3.2.1	Diagnóstico .....	36
3.2.2	Estadiamento.....	36
3.2.3	Procedimento Cirúrgico .....	36
3.2.4	Seguimento dos Pacientes.....	37
3.2.5	Exame Patológico do Tumor Primário.....	38
3.2.6	Técnica de TMA .....	40

3.2.7	Interpretação das Reações Imunoistoquímicas .....	43
3.3	Casuística .....	48
3.3.1	Aspectos Demográficos e Clínicos .....	48
3.3.2	Aspectos Cirúrgicos .....	51
3.3.3	Aspectos Anatomopatológicos.....	53
3.3.4	Seguimento e Sobrevida.....	55
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1	Reações Imunoistoquímicas.....	59
5.1.1	Imunoistoquímica de ALDH1 .....	59
5.1.2	Imunoistoquímica de SOX2.....	64
5.2	Avaliação do Risco de Metástases Linfonodais.....	67
5.2.1	Análise Univariada.....	67
5.2.2	Análise Multivariada.....	69
5.3	Análise de Sobrevida .....	71
5.3.1	Sobrevida Câncer Específica .....	71
5.3.2	Sobrevida Global.....	76
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
6.1	Aspectos Gerais.....	82
6.2	Metástase Linfonodal.....	83
6.3	Imunoistoquímica.....	89
6.4	Imunoistoquímica de ALDH1 .....	90
6.5	Imunoistoquímica de SOX2.....	93
6.6	Considerações Finais .....	96
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Classificação histológica

**Anexo 2** Classificação carcinoma peniano relacionado ao HPV

**Anexo 3** Questionário de dados clínicos

**Anexo 4** Construção de TMA

**Anexo 5** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CEP

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PÊNIS**

O câncer de pênis é uma doença rara em países desenvolvidos, correspondendo a 0,4 a 0,6% de todas as neoplasias malignas. Já em países em desenvolvimento, o câncer de pênis continua sendo um importante problema de saúde (PARKIN et al. 1997), podendo, em alguns países da Ásia, África e América do Sul, chegar até a 20% das neoplasias no homem (ROTOLO e LYNCH 1991). Nos Estados Unidos são diagnosticados anualmente entre 750 a 1000 casos novos desta neoplasia, número que tem se mantido sem alterações nos últimos 50 anos (SCHELLHAMMER et al. 1992). No Brasil, dentre as neoplasias malignas do homem, o câncer de pênis corresponde a aproximadamente 2,1%, com 850 penectomias parciais ou totais por ano, sendo a incidência maior nas regiões Norte e Nordeste, onde as condições socioeconômicas são piores (BRUMINI et al. 1982). Dados mais recentes indicam incidência de 8,3 casos/ 100.000 habitantes no Brasil (PIZZOCARO et al. 2010). O câncer de pênis, de modo geral, tem incidência aumentada a partir da sexta década de vida. Entretanto, no Brasil a maior incidência está entre a quarta e sétima década de vida, com dados mostrando que quase dez por cento dos casos ocorrem em pacientes abaixo de 35 anos (FAVORITO et al. 2008). Diagnóstico em criança é raro, com poucos relatos na literatura (CUNHA et al. 1981; NARASIMHARAO et al. 1985). A presença de fimose, más condições de higiene e baixo padrão socioeconômico são os principais fatores de risco para

desenvolvimento do câncer de pênis (BRINTON et al. 1991). O acesso a água encanada representa um dado isolado de importância no que se refere às condições de higiene, diminuindo a incidência do câncer de pênis de 1,15 para 0,82 caso/100.000 habitantes, como foi demonstrado, por exemplo, na Dinamarca (FRISCH et al. 1995). Aspectos religiosos e culturais podem ser de suma importância para a incidência desta enfermidade. A realização de postectomia e a idade da realização da mesma influencia marcadamente em sua incidência (TSEN et al. 2001). Nos judeus postectomizados logo após o nascimento a incidência referida em alguns trabalhos é nula, enquanto os hindus não operados a incidência pode chegar à 3,1% (LICKLIDER 1961; PAYMASTER e GANGADHARAN 1967; LOPES et al. 1993). Nos maiores trabalhos publicados em relação à etnia, o “SEER database” e o estudo epidemiológico brasileiro, há maior incidência entre os caucasianos (BARNHOLTZ-SLOAN et al. 2007), (FAVORITO et al. 2008). Entretanto, esses trabalhos sugerem que não deva haver distinção entre a raça negra e branca, quando se compara nível sócio econômico semelhante, assim como um estudo tailandês (VATANASAPT et al. 1995). Corroborando com essa hipótese, um trabalho sueco mostra que esses fatores socioeconômicos também se relacionam com a doença na Escandinávia (TORBRAND et al. 2017).

## **1.2 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE PÊNIS**

A etiologia do câncer do pênis ainda não está bem definida. Alguns estudos sugerem que o esmegma (substância que é resultante da descamação das células epiteliais da face interna do prepúcio), que se acumula em homens com má higiene,

principalmente com fimose, seria um agente carcinogênico, convertendo esteróis esmegmáticos em esteróis carcinogênicos pela *Micobacterium smegmatic* (SHABAD 1964; RAJU et al. 1985). Porém, testes experimentais sobre o papel do esmegma têm obtido resultados conflitantes (FISHMAN et al. 1942; DENNIS et al. 1956) e um estudo posterior é frontalmente contra essa afirmação (VAN HOWE e HODGES 2006).

A obesidade está relacionada com vários tipos de neoplasias, inclusive a de pênis. Esse fato pode ser apenas por dificultar a higiene genital, o autoexame peniano ou a exposição da glândula, que aumentaria a quantidade de esmegma acumulada, mas também por possível inflamação crônica, estresse oxidativo e resistência à insulina que acompanham a obesidade (BARNES et al. 2016).

Evidências epidemiológicas têm associado metabólitos do tabaco como fator etiológico (HELLBERG et al. 1987; MADEN et al. 1993; HARISH e RAVI 1995), concretizando ainda mais, a hipótese de que o fumo causa câncer em todo epitélio escamo-celular, independente do contato direto da droga com o tecido. Inclusive, há indícios que esse fator seja dose dependente (TSEN et al. 2001). Entretanto, esta relação é inconsistente, carecendo ainda de melhores estudos.

A infecção por HIV/AIDS não teve relação com nenhum caso de câncer de pênis. Por outro lado, infecção por alguns tipos de HPV tem sido associada na gênese do carcinoma peniano tanto nos estudos epidemiológicos (BRINTON et al. 1991), como em estudos de laboratório, onde segmentos do genoma viral puderam ser encontrados no DNA de célula do carcinoma peniano (ROSEMBERG et al. 1991). Técnicas avançadas de biologia molecular, como reações de cadeias de polimerase e hibridização in situ, forneceram evidências de um papel etiológico da infecção pelo

papiloma vírus humano na gênese do câncer de pênis, pela identificação de sequências específicas de DNA de diferentes tipos de HPV em lesões penianas primárias (malignas ou benignas), mas não em pele normal (VARMA et al. 1991; IWASAWA et al. 1993). O HPV afeta o epitélio escamoso da genitália masculina de maneira similar ao trato genital feminino, incluindo a formação de condilomas e a transformação neoplásica (SARKAR et al. 1992). A infecção ocorre por acesso direto das partículas virais às células basais através de pequenos traumas ou soluções de continuidade, principalmente por contato sexual (BROKER et al. 1987). Apesar de o vírus apresentar mais de 100 subtipos, dos casos associados à infecção pelo HPV, o tipo 16 é identificado em aproximadamente 80 a 90% dos casos, enquanto que o HPV 18 é encontrado em cerca de 10% (CUPP et al. 1995). Um estudo nacional, analisando 82 pacientes relataram a presença do DNA do HPV em 30,5% dos casos, sendo 52% do HPV tipo 16 e 16% do HPV 18. (BEZERRA et al. 2001a). O DNA do HPV tem sido encontrado tanto nos tumores primários como nas lesões metastáticas (BARRASSO et al. 1987; WIENER et al. 1992). Em outros estudos, 70 a 100% dos casos de neoplasia intraepitelial há DNA de HPV, que também está presente em praticamente metade dos carcinomas invasivos (DALING et al. 2005).

Estudos mais recentes demonstram que a presença de HPV estaria relacionado a alguns tipos histológicos como basalóide, warty-basalóide e warty e não relacionado aos tipos verrucoso e papilífero (STANKIEWICZ et al. 2010). Atualmente a infecção pelo HPV é considerada, em muitas regiões pobres, inclusive no Brasil, uma doença epidêmica.

Existem algumas lesões penianas que podem ser consideradas pré-malignas, descritas no quadro abaixo (HAKENBERG et al. 2014):

**Quadro 1** - Lesões penianas relacionadas com carcinoma peniano.

<b>LESÕES ESPORADICAMENTE ASSOCIADAS A CEC PÊNIS</b>	<b>LESÕES PRÉ MALIGNAS (ATÉ 1/3 SE TRANSFORMAM EM CEC PÊNIS)</b>
<b>Corno cutâneo</b>	Neoplasia intraepitelial de alto grau (grau III)
<b>Papulose bowenóide de pênis</b>	Condiloma gigante (Buschke-Lowenstein)
<b>Líquen escleroso</b>	Eritroplasia de Queyrat
<b>Balanite xerótica obliterante</b>	Doença de Bowen
	Doença de Paget (Adenocarcinoma intradérmico)

### 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DO CÂNCER DE PÊNIS

O paciente que apresenta câncer de pênis, de modo geral, pertence a um grupo de homens de baixo nível socioeconômico, que demora a procurar assistência médica especializada. Alguns fatores como viver em área rural, ter sintomas pouco intensos, ser solteiro e alcoólatra, parecem aumentar o atraso para a busca de tratamento médico, enquanto presença de verrugas ou feridas maiores antecipam essa busca (GAO et al. 2016). Além disso, existe a dificuldade de acesso ao serviço médico em cidades pobres e pequenas do interior do Brasil ou nos países subdesenvolvidos da Ásia, África e Américas do Sul e Central, lugares onde essa doença é mais prevalente. Essa demora pode levar de 6-24 meses (BUDDINGTON et al. 1963; LOPES et al. 1994), prejudicando não só o tratamento, mas principalmente o prognóstico desse doente, tanto em termos de mortalidade, como em recuperação sexual (GAO et al. 2016).

O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular, que incide entre 95 a 97% dos casos e caracteriza-se histologicamente por queratinização,

formação de pérola córnea e apresentação de vários graus de atividade mitótica (SCHELLHAMMER et al. 1992). O carcinoma basocelular, o adenocarcinoma, o melanoma e o sarcoma são tipos histológicos que raramente acomete o pênis (ASHLEY e EDWARDS 1957; DEHNER e SMITH 1970; FEGEN et al. 1970; JOHNSON et al. 1973; ANTONELLI et al. 1998; HERNANDEZ et al. 2008). Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reviu a classificação dos carcinomas de pênis, incluindo diversas variantes de importância clínica, incluindo novos tipos histológicos como o carcinoma acantolítico, carcinoma epidermóide papilífero e carcinoma warty-basalóide (CUNHA et al. 2009; CHAUX et al. 2010a e b; EBLE et al. 2004) (Anexo 1). Além disso, a OMS também incluiu uma classificação relacionando os tumores de pênis com a presença de HPV (CUBILLA et al. 2018) (Anexo 2)

O carcinoma de pênis apresenta-se como tumor exofítico ou infiltrativo, na grande maioria dos casos. Geralmente relatado pelos pacientes como “ferida no pênis”, podendo vir como sinal isolado ou em associação com outros sintomas como: dor, inflamação, disúria, prurido e hemorragia. O câncer de pênis geralmente inicia-se na glândula estendendo-se para o prepúcio e corpo do pênis (mais de 75% dos casos), podendo, se não tratado, invadir corpos esponjoso e cavernoso além da uretra (SUFRIN e HUBEN 1987; POMPEO et al. 2006). Quando não tratado nesta fase, evolui infiltrando tecidos adjacentes e dissemina por via linfática, apresentando metástases regionais, preferencialmente para os linfonodos inguinais e depois, para os ilíacos (NARAYANA et al. 1982; PERSKY e DEKERNION 1986). Metástases por via hematogênica são raras, variando entre 1-10% (BEGGS e SPRATT 1964; PURAS et al. 1978). As metástases linfonodais quando não tratadas, invadem o feixe

vasculonervoso dos grandes vasos, levando os pacientes à morte num período de até 2 anos, por sepsis e/ou hemorragias vultuosas por ruptura vascular (BEGGS e SPRATT 1964; DERRICK et al. 1973). Até o momento não existem relatos de remissão espontânea.

#### **1.4 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE PÊNIS E AVALIAÇÃO LINFONODAL**

O diagnóstico definitivo é realizado a partir da biópsia da lesão peniana suspeita, buscando biopsiar a periferia da lesão, evitando áreas necro-hemorrágicas e quando possível, obtendo fragmentos do tecido normal. Pode ser incisional ou excisional naqueles tumores pequenos (LOPES et al. 1994). Não existem relatos de efeitos danosos como disseminação do tumor após biópsia da lesão (EKSTROM e EDSMYR 1958). A propedêutica armada, com o uso da ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética até o momento não parece auxiliar no tumor primário (exceto em casos de obesidade mórbida), e permanece bastante questionada na detecção das metástases linfonodais e pélvicas por apresentar baixa sensibilidade e/ou especificidade (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992), sendo utilizado apenas na detecção de metástases a distância (SCHELLHAMMER et al. 1992; VAPNEK et al. 1992; KAYES et al. 2007, LUCCHESI et al. 2017) A nova ressonância, com aceleração de nano partículas linfotrópicas (LN-7MRI), e a tomografia computadorizada com emissão de pósitrons (18F FDG PET CT) têm estudos com altos valores preditivos positivos e negativos, porém com altos custos, que dificultam o uso clínico, principalmente em países em

desenvolvimento (TABATABAEI et al. 2005; GRAAFLAND et al. 2009; DRÄGER et al. 2018).

A punção por agulha fina dos linfonodos suspeitos pode ser realizada para avaliação locorregional, entretanto apenas resultados positivos devem ser valorizados pela baixa sensibilidade do método (HORENBLAS et al. 1991; BURGERS et al. 1992; VAPNEK et al. 1992). Na tentativa de aprimorar a biópsia de linfonodos inguinais, CABANAS em 1977, utilizando a linfocintilografia a partir do linfático principal no dorso peniano, realizou biópsia do linfonodo positivo pelo gama-probe, determinando o chamado linfonodo sentinela (LS), o primeiro sítio de disseminação da doença. Segundo o próprio, esse procedimento definiria melhor o estadiamento e a conduta, já que a linfadenectomia radical seria evitada nos casos de LS negativo. No entanto, posteriormente, houve relatos em outros estudos, do desenvolvimento de metástases linfonodais em pacientes cujo LS foi negativo, e assim questionado o real valor do método (PERINETTI et al. 1980; WESPER et al. 1986). Alguns anos após, HORENBLAS et al. (2000), utilizando a linfocintilografia pré-operatória com dextram marcado com tecnécio sob auxílio de um gama-probe no intraoperatório, rastreamos os possíveis sítios linfonodais de disseminação metastática, obtendo alto índice de acerto. Dois anos após, a partir da avaliação de 90 pacientes com câncer de pênis, utilizando o mesmo método de rastreamento, foi relatado um índice de falso negativo de 22%, com sensibilidade de 80%, deixando dúvidas sobre a eficiência do método (TANIS et al. 2002). Posteriormente, dois novos estudos indicam novamente altas especificidade e sensibilidade, sendo, portanto, um possível avanço na triagem desses pacientes (LEIJTE et al. 2007, 2009). Atualmente a suspeição da presença de metástases linfonodais pode aumentar dependendo das características do

estadiamento “T” ou do grau do tumor, sendo que local e tamanho do tumor primário, o subtipo patológico, presença de invasões perineural e angiolinfática, espessura e profundidade do tumor e tipo de invasão desse tumor, também tem se mostrado como fatores muito importantes (CUBILLA 2008).

## **1.5 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE PÊNIS**

O estadiamento de uma neoplasia consiste em avaliar a extensão da doença do ponto de vista local, regional e à distância. Representa um tempo fundamental para o prognóstico e definição da terapêutica a ser instituída.

Vários sistemas de estadiamento foram propostos para se estadiar o câncer do pênis.

O estadiamento mais utilizado inicialmente foi o proposto por JACKSON (1966), que classificava a doença em 4 estádios clínicos:

I - Tumor limitado à glândula ou prepúcio.

II - Tumor invadindo o corpo peniano.

III - Tumor com metástases inguinais, porém ressecáveis.

IV - Tumor invadindo estruturas adjacentes e/ou tumor associado com metástases inguinais irresssecáveis e/ou metástases à distância.

Esta classificação é basicamente clínica, não informando sobre características importantes do tumor primário e das metástases, como tamanho, extensão da infiltração da lesão primária, número e localização dos linfonodos comprometidos e grau de diferenciação do tumor (SCHELLHAMMER et al. 1992).

Posteriormente outro sistema de classificação ganhou importância, o TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC) (HARMER 1978), que leva em consideração o tamanho do tumor e/ou seu grau de infiltração em profundidade (T), a situação dos linfonodos inguinais (N) e a presença ou ausência de metástases (M). A avaliação dos linfonodos nesta classificação continua sendo clínica. Para tentar fornecer mais informações sobre a extensão da doença, a classificação TNM incorporou parâmetros histopatológicos do tumor primário e dos linfonodos, como infiltração de corpo cavernoso, uretra, metástases em um ou mais linfonodos inguinais e metástases em linfonodos pélvicos (HERMANEK e SOBIN 1987).

Com menor frequência, fatores tais como tipo histológico, grau histológico e algumas características clínicas são adicionadas ao TNM para prover estádios clínicos. O fator mais importante em termos de prognóstico até o momento é a invasão angiolinfática, que atualmente faz parte da classificação TNM para neoplasia de pênis (LOPES et al. 1996; LEIJTE et al. 2008; SOBIN et al. 2009). Entretanto, a literatura tem mostrado que a inclusão de biomarcadores pode subdividir as classes de tumores existentes nas classificações morfológicas existentes. Além disso, para o uso de novas drogas alvo-específico tais como imatinib, gefitinib e cetuximab, é necessário que o respectivo biomarcador esteja expresso ou mutado para a efetividade do tratamento. Portanto, a identificação de biomarcadores nos diversos tumores é um dos principais alvos de pesquisa hoje. Nos últimos anos, o A.C.Camargo Cancer Center tem contribuído com vários estudos nesse segmento, com avaliação de p53, HPV, E-caderina, MMP-2, MMP-9, MIB-1, Ki-67, (LOPES et al. 2002; BEZERRA et al. 2001b; CAMPOS et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2007).

**Quadro 2 - TNM - Estadiamento TNM (2009).**

<b>ESTADIAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO</b>	
<b>Tx</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>Ta</b>	Tumor verrucoso não invasivo
<b>T1</b>	Tumor invade tecido conectivo sub-epitelial
<b>T1a</b>	Sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (T1G1-2)
<b>T1b</b>	Com invasão linfovascular ou pobremente diferenciado/ indiferenciado (T1G3-4)
<b>T2</b>	Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
<b>T3</b>	Tumor invade uretra ou próstata
<b>T4</b>	Tumor invade estruturas adjacentes
<b>ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS</b>	
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástases em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Linfonodo inguinal unilateral palpável e móvel
<b>N2</b>	Linfonodos inguinais bilaterais ou múltiplos palpáveis e móveis
<b>N3</b>	Massa nodal inguinal fixa ou linfadenopatia pélvica, unilateral ou bilateral
<b>ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS</b>	
<b>Mx</b>	Metástases a distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância
<b>M1</b>	Metástases à distância

**Fonte:** SOBIN et al. (2009)

**Quadro 3 - TNM – Classificação anatomia patológica TNM (2009).**

<b>ESTADIAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO (IGUAL ESTADIAMENTO CLÍNICO)</b>	
<b>Tx</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>Ta</b>	Tumor verrucoso não invasivo
<b>T1</b>	Tumor invade tecido conectivo sub-epitelial
<b>T1a</b>	Sem invasão linfovascular e bem ou moderadamente diferenciado (T1G1-2)
<b>T1b</b>	Com invasão linfovascular ou pobremente diferenciado/ indiferenciado (T1G3-4)
<b>T2</b>	Tumor invade corpo cavernoso ou esponjoso
<b>T3</b>	Tumor invade uretra ou próstata
<b>T4</b>	Tumor invade estruturas adjacentes
<b>ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS</b>	
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástases em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástases única em linfonodo inguinal superficial
<b>N2</b>	Metástases múltiplas ou bilaterais em linfonodos inguinais
<b>N3</b>	Metástases em linfonodos pélvicos, invasão extra nodal de qualquer linfonodo metastático
<b>ESTADIAMENTO DOS LINFONODOS REGIONAIS</b>	
<b>Mx</b>	Metástases a distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância
<b>M1</b>	Metástases à distância
<b>GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</b>	
<b>Gx</b>	Grau ou diferenciação não podem ser avaliados
<b>G1</b>	Bem diferenciados
<b>G2</b>	Moderadamente diferenciados
<b>G3-4</b>	Pobremente diferenciados / indiferenciados

**Fonte:** SOBIN et al. (2009)

## 1.6 ASPECTOS TERAPÊUTICOS DO CÂNCER DE PÊNIS

A principal forma de tratamento do câncer de pênis é a cirurgia, que se baseia na ressecção do tumor primário e linfadenectomia inguinal ou ínguino-íliaca bilateral (CATALONA 1980; 1988; HORENBLAS et al. 1991; LOPES et al. 1996).

Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico e o aperfeiçoamento de novas técnicas cada vez menos invasivas, em prol do efeito cosmético, melhor qualidade de vida e reintegração biopsicossocial do paciente, priorizando sempre, a eficiência do tratamento e a cura do tumor, as lesões pequenas (em estádios iniciais) podem ser tratadas de forma conservadora (LONT et al. 2006). Isso pode ser realizado tanto por radioterapia, laser terapia como até ressecções regradas, com excisão local da lesão, respeitando com rigor as margens de segurança (MOHS et al. 1992; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007). Há algumas restrições, como pacientes obesos, diabéticos, imunossuprimidos e em terapia anticoagulante, que têm tido piores resultados por dificuldade na realização do procedimento e/ou na cicatrização adequada do tratamento da lesão (TIETJEN e MALEK 1998).

Entretanto, esses casos necessitam de protocolos bem definidos e indicações criteriosas, além de um acompanhamento rigoroso no pós-operatório, pois os índices de recidiva sejam locais ou regionais são aumentados (ODLAND 1997; LONT et al. 2006). Com isso, o sucesso desses tratamentos só é possível com vigilância intensa, ao menos a cada 3 meses inicialmente, o que geralmente não é possível na maioria dos pacientes portadores de câncer de pênis, por motivos socioeconômicos (SHINDEL et al. 2007). Sendo assim, a orientação atual é para que não se faça retratamento com técnicas menos invasivas após duas recidivas e que tumores

maiores ou iguais a “T2” devam ser tratados com amputação parcial ou total (MEIJER et al. 2007).

Apesar do impacto mutilante, as amputações parciais ou totais do pênis são na prática clínica, as cirurgias mais realizadas no tratamento do carcinoma peniano, mesmo porque, na maioria dos casos o diagnóstico do tumor é feito tardiamente, já em estágio avançado. Amputações parciais devem apresentar margem entre 1,0 e 1,5 cm do tumor. Somente com margens adequadas, as taxas de recidivas locais são baixas (DEKERNION et al. 1973). Em lesões que infiltrem a base do pênis ou em tumores extensos, com cotos penianos inadequados, geralmente menores que 4,0 cm, as amputações totais com uretostomia perineal são mais adequadas (DAS 1992).

A outra etapa fundamental na cura do câncer de pênis é a abordagem terapêutica dos linfonodos regionais quando necessário, com índice de cura pós linfadenectomia variando de 30-70%, visto que quando presente e não tratados, o óbito ocorre em geral dentro de dois anos (DEKERNION et al. 1973; CATALONA 1980; POMPEO 1993). A sobrevivência do doente é inversamente proporcional ao número de linfonodos acometidos, com várias séries reportando sobrevivências favoráveis em indivíduos com baixas taxas de acometimento linfonodal pós linfadenectomia (SRINIVAS et al. 1987; FRALEY et al. 1989; ORNELLAS et al. 1994). Apesar da baixa acurácia dos métodos outrora utilizados na avaliação linfonodal (SUFRIN e HUBEN 1987) e da alta morbidade da linfadenectomia (HERR 1992; LOPES et al. 1996), a seleção dos pacientes deve ser criteriosa (BEGGS e SPRATT 1964; KAMAT et al. 1993; COBLENTZ e THEODORESCU 2002), pois é a última e única chance de cura do doente.

Muitos protocolos advogam o uso do antibiótico durante 2 a 6 semanas pós tratamento do tumor primário do pênis, não só para um maior controle da infecção subjacente ao tumor, já que a linfadenopatia inflamatória é um diagnóstico diferencial importante, mas também, pela redução da morbidade perioperatória relacionada com a linfadenectomia inguinal posterior (ROTOLO e LYNCH 1991; SCHELLHAMMER et al. 1992).

Existe uma polêmica entre a realização de linfadenectomias terapêuticas ou profiláticas. Alguns estudos mostram que a realização das primeiras propicia uma sobrevida semelhante quando da realização das últimas (EKSTROM e EDSMYR 1958; BEGGS e SPRATT 1964); entretanto, estudos mais recentes não confirmam estes achados, mostrando índices de sobrevidas superiores quando realizadas profilaticamente em comparação com as terapêuticas, principalmente nos T2 e T3 (MCDOUGAL et al. 1986; FRALEY et al. 1989). Dessa forma, a tendência atual é realizar linfadenectomias profiláticas nos tumores com estágio T2 e T3 e sem linfonomegalia palpável. A forma de realização da linfadenectomia também é variável, podendo ser aberta, videoendoscópica ou videoendoscópica com auxílio de robô (CATALONA 1988). Atualmente, a cirurgia videoendoscópica, que já é utilizada na dissecação linfática pélvica desde 1990 (SCHUESSLER et al. 1991), vem trazendo contribuições importantes não só na linfadenectomia pélvica, mas também na linfadenectomia inguinal nos pacientes com carcinoma de pênis. TOBIAS-MACHADO et al. (2007) iniciou em nosso meio, com resultados favoráveis, como menor morbidade, menor permanência hospitalar, número de linfonodos ressecados satisfatórios, além de recuperação pós-operatória melhor e mais rápida. Atualmente com avanço da tecnologia, a cirurgia laparoscópica assistida por robô já é uma

realidade nos grandes centros, com resultados excelentes (ELSAMRA e POCH 2017). A lateralidade da linfadenectomia é definida pela drenagem linfonodal do órgão, que é do tipo cruzada, assim, a linfadenectomia bilateral deve ser sempre o padrão, já que o risco de metástases contralaterais é de até 30% (SRINIVAS et al.1987; LOPES et al. 1996). Por outro lado, a linfadenectomia pélvica, só deve ser realizada quando da positividade dos linfonodos inguinais, pois a disseminação pélvica é encontrada apenas em 15 a 30% dos casos (SRINIVAS et al. 1987; PURAS et al. 1978) e a disseminação linfática exclusiva para os linfonodos pélvicos é bastante rara (ABI-AAD e DEKERNION 1992).

## **1.7 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE PÊNIS**

A presença de metástases linfonodais é o principal fator de prognóstico no carcinoma de pênis, (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977), prevalecendo como consenso em vários estudos (NARAYANA et al. 1982; YOUNG et al. 1991; POMPEO 1993; HORENBLAS et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996). Corroborando este consenso, SUFRIN e HUBEN (1987), obtiveram 27,5% e 66,2% de sobrevida em 5 anos, dos pacientes com e sem metástases linfonodais, respectivamente; SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28% para aqueles com metástases e de 74% para os sem metástases, também em relação à sobrevida em 5 anos.

Ao longo dos anos, inúmeros autores tentaram correlacionar fatores clínicos e/ou patológicos com comprometimento linfonodal pelo carcinoma peniano, buscando escores cada vez mais específicos, proporcionando uma seleção correta dos

pacientes com melhor ou pior prognóstico e, a partir daí uma abordagem eficaz com o mínimo de morbimortalidade e o máximo de curabilidade da doença. Alguns autores correlacionaram a extensão do comprometimento linfonodal com o prognóstico, sugerindo até algumas classificações como a que dividia o status linfonodal em N1- Apenas 1 linfonodo comprometido; N2- 2-6 linfonodos comprometidos; N3- >6 linfonodos, sendo N3a- Unilateral e N3b- Bilateral. N4- Comprometimento extra nodal (SRINIVAS et al. 1987). Neste mesmo estudo, foi relatada sobrevida em 5 anos de 50-80% nos casos de N1 e N2 e de 4-12% nos casos de N3 e N4. HORENBLAS et al. (1993), observaram que pacientes com mais de 2 linfonodos inguinais metastáticos, apresentavam não só maior incidência de metástases linfonodais contralaterais e pélvicas, como também maior índice de óbito pela doença. Estudos mais recentes, também obtiveram uma correlação diretamente proporcional do número de linfonodos com o aumento da taxa de óbito pela doença (LOPES et al. 2000).

Quando da correlação de fatores clínicos e histológicos do tumor primário com o prognóstico do carcinoma peniano, SOLSONA et al. (1992), correlacionando o sítio do tumor com o prognóstico da doença, observou que 64,3% dos pacientes com invasão de corpo cavernoso apresentaram metástase linfonodais, diferentemente daqueles sem invasão com apenas 4,2% de metástases. Posteriormente, a partir de uma análise prospectiva, o mesmo autor demonstrou que no estágio T1 havia 11% de comprometimento linfonodal contra 63% no estágio T2 e T3 (SOLSONA et al. 2001). LOPES et al. (1996), avaliando espessura tumoral e presença de invasão vascular e linfática de células tumorais, observaram que tumores com profundidade maiores que 5mm, apresentavam um número maior de metástases linfonodais em

comparação aos tumores mais superficiais, e que a embolização tanto vascular quanto linfática é fator preditivo para metástase linfonodal, fato este, também observado por outros autores (FRALEY et al. 1989; SLATON et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2006).

O grau de diferenciação do tumor é outro aspecto aventado por muitos autores como preditor, não somente de comprometimento linfonodal, mas também de sobrevida global (POMPEO 1993; SLATON et al. 2001). FRALEY et al. (1985), ratificaram esta afirmativa, quando observaram que pacientes com tumores pouco diferenciados, apresentam mais metástases linfonodais e menor sobrevida quando comparadas a lesões mais diferenciadas. SOLSONA et al. (2001), relatou risco de metástases linfonodais de 15% para os tumores de grau 1, 67% para o grau 2 e até, 75% para o grau 3. GUIMARÃES et al. (2006), avaliaram o tipo de invasão patológica do carcinoma epidermóide do pênis (baseada em padrões histológicos de tumores de outros órgãos em seres humanos), e procuraram correlacioná-la ao comprometimento linfonodal. Observaram uma significância estatística para o tipo infiltrativo (invasão em bloco, que infiltra amplamente o estroma do órgão) com 65% de metástase linfonodal em comparação ao tipo pushing (invasão em bloco com interface tumor hospedeiro bem delimitada) com apenas 23% de metástase nos linfonodos.

Atualmente, alguns autores estão desenvolvendo nomogramas buscando avaliar o prognóstico dos pacientes com neoplasia peniana. CHAUX et al. (2009) realizaram um índice prognóstico de presença de metástases linfonodais e de sobrevida, baseado em três variáveis: grau histológico, profundidade de invasão tumoral e invasão perineural. As variáveis grau histológico e profundidade de

invasão variam de 1 a 3, com a maior numeração para os tumores mais agressivos. Quando da presença de infiltração perineural soma-se mais um ponto. A orientação desse índice é não realizar linfadenectomia em casos de soma 2 e 3, sempre realizar nos casos de soma 5 a 7 e avaliar individualmente os casos de soma 4. Em outro estudo, FICARRA et al. (2006), desenvolveram um nomograma baseado no estágio clínico dos linfonodos inguinais e nos achados patológicos dos tumores primários tratados que pudesse estimar o risco de desenvolvimento de metástases nos linfonodos e assim, tivesse o papel de selecionar com maior critério quais os pacientes que realmente se beneficiariam com a linfadenectomia radical em relação ao prognóstico e sobrevida, independente da morbimortalidade intrínseca do procedimento. Os fatores de maior risco para o desenvolvimento de metástase linfonodal foram em ordem decrescente: invasão vascular e/ou linfática; presença clínica de linfonodomegalia; grau histológico do tumor; tipo de crescimento tumoral e infiltração de corpo esponjoso; invasão de corpo cavernoso; infiltração de uretra; espessura do tumor. Esses fatores somados dão o score do paciente, sendo que quanto maior a pontuação, maior o risco de metástases linfonodais. KATTAN et al. (2006), aperfeiçoando este nomograma, criou um segundo nomograma baseado desta vez, nos achados patológicos pós-amputação e pós-linfadenectomia. Observaram que a espessura tumoral, nesse novo nomograma representa um risco bem aumentado de desenvolvimento de metástases linfonodais quando comparado ao nomograma anterior. O risco na infiltração cavernosa suplantou o da infiltração esponjosa em relação também ao nomograma anterior, e o risco diminuiu, entretanto, quando o fator analisado foi tipo de crescimento tumoral (vertical ou superficial). O HPV, infecção associada ao carcinoma de pênis, também muito estudado como fator

correlacionado ao comprometimento linfonodal, não demonstrou influência estatisticamente significativa, quando da presença isolada do DNA-HPV em relação ao aumento da incidência de metástases linfonodais (VILLA e LOPES 1986; BEZERRA et al. 2001b). Por outro lado, a associação da presença do DNA-HPV com o aumento da expressão do p53 são relacionadas à um pior prognóstico da doença (LOPES et al. 2002).

Contudo, apesar de todos esses estudos tentarem correlacionar os fatores clínicos e/ou anatomopatológicos, não existe ainda uma precisão incontestável no estadiamento do tumor. Com o aperfeiçoamento de técnicas de anatomia patológica e o desenvolvimento tecnológico, passou-se a se estudar fatores biomoleculares preditores de prognóstico, buscando assim, ampliar as ferramentas disponíveis para o melhor estadiamento e seleção de pacientes. LOPES et al. (2002), a partir de um estudo de 82 pacientes com carcinoma peniano, demonstraram que a hiperexpressão do p53 estava associada à uma alta incidência de metástases linfonodais tanto na análise univariada quanto na multivariada.

A partir do estudo da Prostaglandina E2 (PGE2) e Ciclooxigenase (COX) em carcinoma peniano, foi observada uma expressão aumentada de ambos biomarcadores, tanto através da imunohistoquímica, quanto pela técnica do “western blotting” somente em células tumorais, sem crescimento dos mesmos em tecido normal do pênis (GOLIJANIN et al. 2004). CAMPOS et al. (2006), avaliaram, através da técnica de imunohistoquímica, a caderina-E (E-caderina), a metaloproteinase 2 (MMP-2) e a metaloproteinase 9 (MMP-9) como fatores prognósticos no câncer peniano, relatando uma associação significativa da baixa expressão da caderina-E com metástases linfonodais. Em relação à recorrência da

doença, a expressão da MMP-9 mostrou-se como fator independente de risco. SOARES et al. (2006), confrontando os três tipos de crescimento e invasão do carcinoma peniano com a expressão imunohistoquímica das metaloproteinases dos tipos 2 e 9, obtiveram uma associação interessante entre a expressão aumentada das metaloproteinases 2 e 9 com um padrão maior de invasão, principalmente naqueles tumores com pouca diferenciação histológica. GUIMARÃES (2003) questionaram o valor prognóstico do PCNA e do MIB-1/KI-67 no CEC de pênis, demonstrando relação com a presença de linfonodos metastáticos, porém sem relação com a sobrevida.

Infelizmente o crescimento das pesquisas em câncer de pênis ocorre de forma muito mais lenta em comparação a outros tumores urológicos, como próstata, bexiga e rim. Analisando nesse momento a literatura mundial, podemos afirmar que há menos de 50 estudos significativos com marcadores tumorais nesse tumor, sendo que não há nenhum relacionando marcadores de células tronco tumorais.

## **1.8 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS**

As células-tronco (SC) possuem a capacidade de diferenciar em diversos tipos de células de nosso organismo e isso faz delas objeto de grande interesse na ciência. Recentemente, diversas pesquisas mostraram os resultados positivos da utilização de células-tronco no tratamento de doenças, como hemofilia, osteogênese imperfeita, lesões de cartilagem ou na recuperação da medula óssea após quimioterapia/radioterapia, na recuperação do músculo cardíaco após infarto do miocárdio e no tratamento de lesões neurais após acidente vascular encefálico ou

trauma. Além disso, diversos estudos clínicos envolvendo células-tronco estão em desenvolvimento e os resultados são bastante promissores.

No entanto, as mesmas qualidades que tornam as células-tronco valiosas na medicina regenerativa, na engenharia tecidual e na biotecnologia, como a capacidade de proliferar dando origem a outras células-tronco, também podem causar problemas à saúde. Cientistas descobriram que mutações que afetam o potencial de diferenciação das células-tronco, combinadas com a falta de controle da sua capacidade proliferativa, podem transformá-las em “células-tronco tumorais” (CSC).

As neoplasias malignas não apresentam o mesmo tipo de formação e progressão, entretanto os cientistas têm demonstrado que uma grande parte de tumores seguem a hipótese das células tronco tumorais (CSC). Essas células seriam uma subpopulação de células com potencial ilimitado de replicação e capacidade de se autorrenovar, características que as diferenciam das demais células não tumorigênicas, além de exclusiva capacidade de iniciar e manter o crescimento tumoral (DALERBA et al. 2007; SHACKLETON 2010). As primeiras evidências de CSC foram descritas nas leucemias em um estudo publicado por BONNET e DICK (1997), os quais demonstraram que um grupo específico de células tumorais foi capaz de replicar tumores in vitro com grande facilidade, enquanto o mesmo não era obtido com o restante das células leucêmicas. Estas células foram diferenciadas das outras por sua capacidade de expressar a molécula CD34 e não expressar a molécula CD38, sendo então denominadas como CSC. Posteriormente, essas células também foram identificadas em tumores sólidos. Na mama, AL-HAJJ et al. (2003) demonstraram que o implante de cerca de 100 células CD44+ e CD24- foi capaz de

formar tumores primários e secundários, enquanto o mesmo efeito não foi obtido com o implante de dezenas de milhares de células tumorais normais (PINHO 2009).

Nas pesquisas atuais, as populações tumorigênicas são separadas das demais com base na utilização de determinados marcadores (como o ALDH1 por exemplo) e posteriormente são realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar as propriedades “tronco” da população separada, que geralmente demonstra alta expressão de fatores de transcrição relacionados à autorrenovação de células embrionárias (como o SOX2, por exemplo) (SILVA 2017)

## **1.9 SOX2**

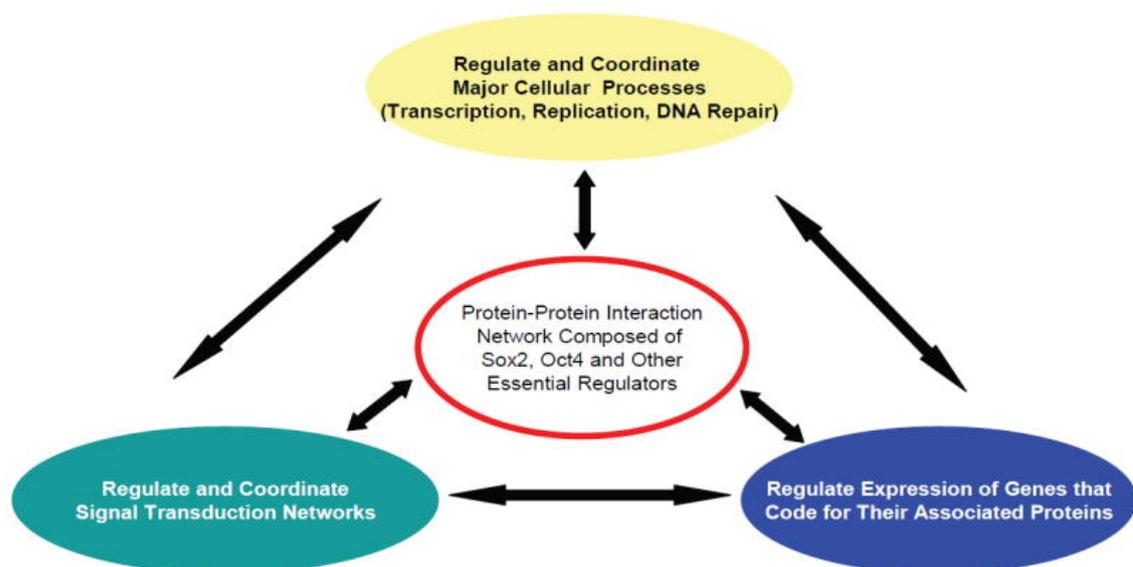
### **1.9.1 Definição SOX2**

SRY (região determinante do sexo Y) -related HMG-box gene 2, também conhecido como SOX2 é um membro da família de fatores de transcrição SOX, que desempenham papéis essenciais em várias fases de desenvolvimento de mamíferos. Este marcador faz parte de um grupo de proteínas altamente ligadas a domínios de DNA, conhecidos como domínios HMG (Grupo de alta mobilidade) contendo cerca de 80 aminoácidos. SOX2 tem um papel fundamental na manutenção de células-tronco embrionárias (ESC) e neurais e é uma grande promessa em pesquisa envolvendo indução da pluripotência, um campo emergente e muito promissor da medicina regenerativa. As evidências estão aumentando sobre a relação crucial dessa proteína no desenvolvimento da embriogênese e do câncer. Em carcinoma de células escamosas, as amplificações de genes têm frequentemente como alvo a região 3q26. Como o gene para SOX2 está dentro desta região, ele é considerado um oncogene

(STEVANOVIC et al. 1994). Este gene está dentro de um íntron de outro gene chamado SOX2 (SOX2OT) e é um fator chave de regulação vários carcinomas, como citado acima, dirigindo muitos genes envolvidos na progressão tumoral. Sua hiperexpressão ativa também a migração celular e crescimento independente de ancoragem.

Esse fator de transcrição codifica um membro da família de fatores de transcrição HMG-box (SOX) relacionados a SRY (SOX) envolvidos na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino das células.

A rede de interação proteína-proteína das células tronco embrionárias (ESC) que inclui SOX2 e OCT4, faz parte de um circuito de sinalização e transcrição altamente interdependente que integra todas as principais funções celulares, como visto na Figura 1.

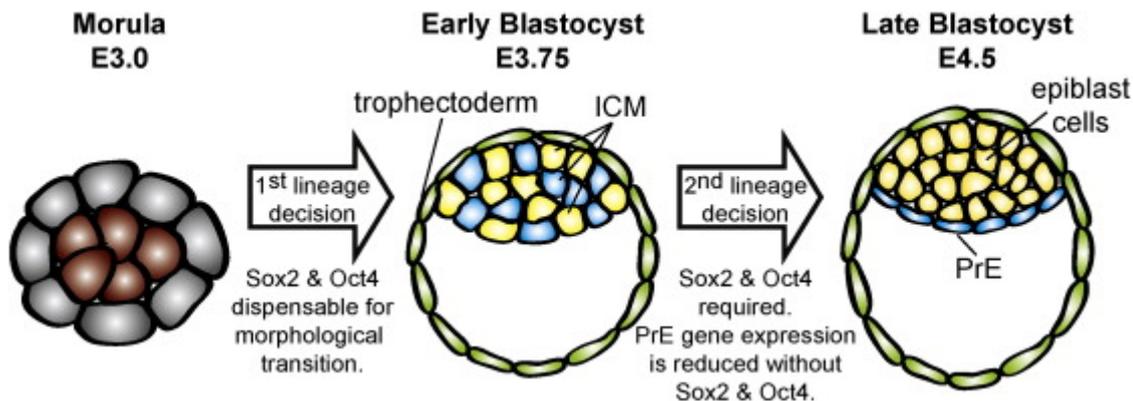


Fonte: Extraído de RIZZINO (2013)

**Figura 1** - Modelo esquemático das funções das ESC, entre elas SOX2

As ESC são caracterizadas por três características distintivas: pluripotência (capacidade de diferenciação em tecidos derivados das três camadas germinativas), auto renovação (manutenção de um estado indiferenciado) e proliferação ilimitada. (RIZZINO 2013).

A pluripotência refere-se à capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células do embrião quando o estímulo apropriado é fornecido. Um dos modelos de células-tronco mais precoce e bem estabelecido para a pluripotência são células-tronco embrionárias de ratos (mESC), que foram derivadas da massa celular interna (ICM) do blastocisto do rato há quase três décadas. O estabelecimento de condições de cultura bem definidas permite que os mESC se auto renovem infinitamente, mantendo um estado pluripotente *in vitro*, fornecendo uma fonte útil de células para estudos moleculares e diferenciação em uma variedade de tipos celulares desejados. Os fatores de transcrição SOX2, Oct4 e Nanog são fundamentais para a regulação da pluripotência e também se ativam e entre si, constituindo uma rede reguladora transcricional central com recursos de ativação automática e feixes avançados. Sua importância no desenvolvimento inicial do embrião é destacada por vários estudos. No caso do SOX2, AVILION et al. (2002) demonstrou que a supressão desse gene em camundongos conferiu a letalidade precoce após atingir o estágio de blastocisto, que não sobrevivem após a implantação. (Figura 2)



**Fonte:** Extraído de RIZZINO (2013)

**Figura 2** - Desenvolvimento embrionário com identificação de momento chave da presença de SOX2 e Oct4.

Pouco tempo depois, demonstrou-se que o bloqueio de SOX2 em células-tronco embrionárias de rato (mESC) interrompia a sua autorrenovação e induzia diferenciação (CHEW et al. 2005).

Um ano depois, o interesse em SOX2 aumentou dramaticamente com a descoberta de TAKAHASHI e YAMANAKA (2006), demonstrando a conversão de fibroblastos embrionários de ratos em célula-tronco pluripotente induzida (iPS) por expressão ectópica de SOX2, juntamente com OCT4, KLF4 e cMYC.

### 1.9.2 SOX2 e Câncer

Dentro de alguns anos após a descoberta das células iPS, vários relatos de expressão de SOX2 em câncer humano já apareceram. Isso logo se transformou em uma avalanche de estudos examinando SOX2 em câncer humano. Os termos de pesquisa "SOX2 e câncer" geram mais de 2500 acessos no banco de dados Medline (PubMed) e mais de 17.000 acessos no PubMed Central. Desde 2006, o SOX2 tem sido implicado no crescimento, na tumorigenicidade, na resistência aos

medicamentos e na metástase em pelo menos 25 tipos diferentes de câncer, incluindo câncer de ovário, pulmão, pele, cérebro, mama, próstata e pâncreas (Quadro 4). Na maioria destes tumores, foi relatado que SOX2 aumentou a expressão ou a amplificação de genes no tecido tumoral; entretanto, os efeitos da SOX2 na tumorigenicidade, prognóstico e resistência aos medicamentos em câncer humano só começaram a ser explorados, tendo muito a se desenvolver. Porém é evidente, pelo impressionante número de trabalhos publicados até o momento que o SOX2 é um dos principais atores do câncer e potencial alvo terapêutico (WUEBBEN e RIZZINO 2017).

**Quadro 4** - Expressão de SOX2 e prognóstico dos pacientes em diferentes tipos de neoplasias

<b>Tipo de Câncer</b>	<b>Aumento de expressão</b>	<b>Queda de expressão</b>	<b>Pior prognóstico / Graus maiores</b>	<b>Bom prognóstico / Graus menores</b>
Mama	Chen et al. 2008		Chen et al. 2008	
	Rodriguez-Pinilla et al. 2007		Piva et al. 2014	
Colo-retal	Long et al. 2009		Saigusa et al. 2009	
			Lundberg et al. 2014	
			Talebi et al. 2015	
Carcinoma embrionário (Testículo)	Biermann et al. 2007			
Esôfago	Gen et al. 2010		Wang et al. 2009	
	Bass et al. 2009			
	Long et al. 2009			
Sarcoma de Ewing	Ren et al. 2016			
Gástrico	Tian et al. 2014	Chen et al. 2016		Zhang et al. 2010
		Wang et al. 2015		Chen et al. 2016
		Otsubo et al. 2008		Wang et al. 2015
		Tsukamoto et al. 2005		
		Li X et al. 2004		

## Cont/ Quadro 4

Tipo de Câncer	Aumento de expressão	Queda de expressão	Pior prognóstico / Graus maiores	Bom prognóstico / Graus menores
Glioblastoma	Alonso et al. 2011		Annovazzi et al. 2011	
	Schmitz et al. 2007		Ma et al. 2008	
	Phi et al. 2008			
	Annovazzi et al. 2011			
CEC Cabeça e Pescoço	Bourguignon et al. 2012		Lee et al. 2014	Bayo et al. 2015
Carcinoma Hepatocelular			Sun et al. 2013	
Adenocarcinoma de Pulmão	Sholl et al. 2010		Sholl et al. 2010	
Câncer de Pulmão não pequena célula			Chou et al. 2013	
Câncer de Pulmão pequena célula	Güre et al. 2000			
	Rudin et al. 2012			
Câncer de Pulmão escamoso	Bass et al. 2009			Lu Y et al. 2010
	Hussenet et al. 2010			
	Yuan et al. 2010			
	Sholl et al. 2010			
	Wilbertz et al. 2011			Wilbertz et al. 2011
Câncer de Pulmão neuroendócrino	Sholl et al. 2010			
Melanoma	Laga et al. 2011		Chen et al. 2013	
Carcinoma Nasofaríngeo			Wang et al. 2012	
CEC oral	Freier et al. 2009		Du et al. 2011	
Ovário	Belotte et al. 2015		Wang et al. 2014	Belotte et al. 2015
	Ye et al. 2011		Zhang et al. 2012	
	Zhang et al. 2012			
Pâncreas	Sanada et al. 2006			
Próstata	Sattler et al. 2000		Kregel et al. 2013	
	Jia et al. 2011		Jia et al. 2011	
Carcinoma Naso Sinusal	Schrock et al. 2013		Schrock et al. 2013	

**Fonte:** Adaptado de WUEBBEN e RIZZINO (2017)

A expressão de SOX2 pela técnica de imunohistoquímica é viável em tecido peniano, como demonstrou MAIER et al. (2011) em estudo em que testou a expressão dessa proteína em tecido peniano normal e em câncer de pênis. Esse estudo não correlacionou a presença ou intensidade da expressão com dados clínicos ou prognósticos.

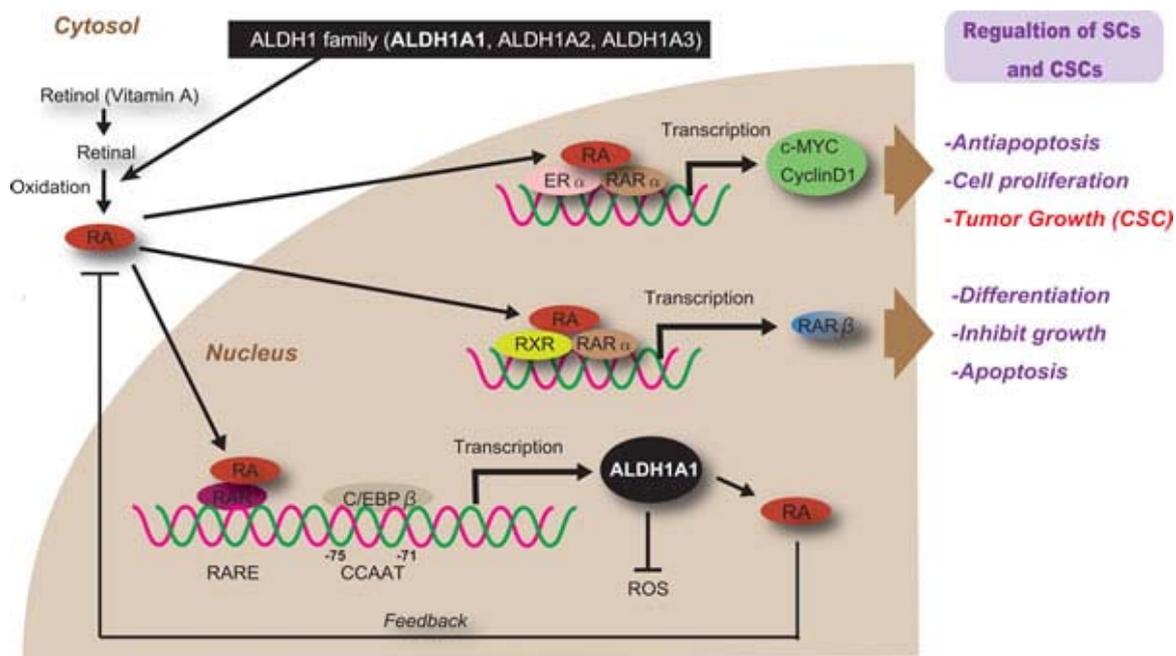
## **1.10 ALDH1**

### **1.10.1 Definição ALDH1**

As aldeído desidrogenases formam uma família de enzimas intracelulares localizados em quase todos os tecidos de mamíferos, podendo ser no citoplasma, mitocôndria ou núcleo, que catalisam a oxidação de aldeídos para o ácido carboxílico. Participam na desintoxicação do acetaldeído, do metabolismo de aminas biogênicas, corticosteróides e ácido retinóico (MARCATO et al. 2011). A ALDH1 está localizada no braço longo do cromossomo 9 (9q21.13)

Até hoje 19 isoformas de ALDH foram descritas, sendo a ALDH1 a isoforma citosólica, que é requerida na conversão de retinol (vitamina A) para ácido retinóico, que é responsável por diversas vias de desenvolvimento celular; murinas e células tronco hematopoiéticas humanas foram isoladas com base nos seus níveis elevados de atividade de ALDH (ZHANG et al. 2012).

Historicamente, apesar das evidências da atividade de ALDH nas células tronco normais (SC) e células tronco de câncer (CSC), ninguém até o momento conseguir demonstrar os mecanismos por onde isso ocorre (TOMITA et al. 2016) (Figura 3)



Fonte: Extraído de TOMITA et al. (2016)

**Figura 3** - Modelo esquemático das funções de ALDH1

Inicialmente o ALDH foi relacionado em cânceres hematopoiéticos (CHEUNG et al. 2007), mas logo após foi também descrito em tumores sólidos como por exemplo, câncer da mama, descrito inicialmente em um estudo de GINESTIER et al. (2007), que demonstraram que a expressão de ALDH1 era um preditor de pior prognóstico clínico em tumores de mama.

Além disso, existem vários estudos que demonstram algumas células cancerosas adquirem resistência quimioterápicos através da ativação transcripcional da expressão de ALDH1 (KASTAN et al. 1990; MOREB et al. 1992; YOSHIDA et al. 1993).

### **1.10.2 ALDH1 e Câncer**

Vários autores estão trabalhando na relação da expressão de ALDH1 com câncer. Inicialmente, já existem alguns artigos sobre a relação desse marcador e a resposta ao quimioterápico em vários tumores diferentes como melanoma, sarcoma e útero (RAHADIANI et al. 2011; LUO et al. 2012; LOHBERGER et al. 2012). Outras linhas de pesquisas estudam a relação de ALDH1 com metástase linfonodal nos tumores, que assim como no pênis, determinam o prognóstico do paciente. Alguns órgãos já estudados são, por exemplo, vesícula biliar, esôfago e mama (LIU et al. 2011; WANG et al. 2012; KHOURY et al. 2011).

A relação definitiva entre sobrevida e este marcador também está sendo bastante estudada em diversos tecidos, como por exemplo mama, pulmão, bexiga e pâncreas (YOSHIOKA et al. 2010; SU et al. 2010; KAHLERT et al. 2011; DIMOU et al. 2012).

Interessante observar que não há uma definitiva relação da expressão desse marcador com o prognóstico em todos os estudos, mesmo quando estudo o mesmo órgão, como pode ser vista no quadro abaixo.

**Quadro 5** - Expressão de ALDH1 e prognóstico dos pacientes em diferentes tipos de neoplasias

TECIDO	TIPO DE CÂNCER	PROGNÓSTICO	REFERÊNCIA
FÍGADO	HEPATOCARCINOMA	FAVORÁVEL	TANAKA 2015
		FAVORÁVEL	SUZUKI 2012
		SEM RELAÇÃO	DOLLE 2012 / MA 2008
PULMÃO	NÃO PEQUENAS CÉLULAS	RUIM	LI X 2012
		RUIM	JIANG 2009
		FAVORÁVEL	GAO 2015
OVÁRIO	ADENOCARCINOMA	RESISTÊNCIA QT	WANG et al. 2012
		FAVORÁVEL	HUANG et al. 2014
ESÔFAGO	CEC	RUIM	YANG 2014
ESTÔMAGO	ADENOCARCINOMA	RUIM	LI XS 2014
		SEM RELAÇÃO	WAKAMATSU 2012
PÂNCREAS	ADENOCARCINOMA	RUIM	RASHEED 2010
		FAVORÁVEL	KAHLERT et al. 2011
MAMA	CARCINOMA DUCTAL	RUIM	GINESTIER et al. 2007
		RUIM	MORIMOTO 2009
COLORRETAL	ADENOCARCINOMA	SEM RELAÇÃO	LUGLI 2010
		RUIM + RESISTÊNCIA QT	KAHLERT et al. 2012

**Fonte:** Adaptado de TOMITA et al. (2016).

Apesar da busca por marcadores em câncer de pênis que possam demonstrar quais tumores são mais agressivos e de pior prognóstico, para que possamos selecionar quais os pacientes candidatos a terapia mais radical, até o momento nenhuma pesquisa foi realizada a fim de caracterizar a expressão desses marcadores selecionados por esse estudo.

## **2 OBJETIVOS**

O presente estudo tem como objetivos:

- 1 Estudar a expressão imunoistoquímica de SOX2 e ALDH1 na progressão tumoral em CEC de pênis;
- 2 Correlacionar a imunoexpressão de SOX2 e ALDH1 com fatores clínicos, demográficos e anatomopatológicos selecionados;
- 3 Determinar o valor da expressão imunoistoquímica SOX2 e ALDH1 na frequência de metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes;

### **3 POPULAÇÃO E MÉTODOS**

#### **3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO**

Foram incluídos no estudo os pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa A.C.Camargo Cancer Center no período de 1953 a 2012, com diagnóstico de carcinoma epidermóide do pênis. Foram selecionados os registros de 224 pacientes habilitados para o estudo.

Após avaliação dos prontuários médicos e seleção de blocos de parafina e lâminas para confirmação diagnóstica 203 pacientes permaneceram para a análise final.

##### **3.1.1 Critérios de Inclusão**

Pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis, submetidos à amputação parcial ou total do pênis e a linfadenectomia regional, uni ou bilateral em qualquer momento do seu seguimento.

Para os pacientes não submetidos à linfadenectomia, foram considerados aqueles com seguimento mínimo de cinco anos.

Pacientes que possuíam material arquivado em parafina suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

### **3.1.2 Critérios de Exclusão**

Pacientes que apresentavam metástase à distância ao diagnóstico e que tinham sido submetidos a algum tipo de tratamento pélvico prévio ou tratamento adjuvante.

Pacientes com segundo tumor primário diagnosticado durante a evolução.

## **3.2 METODOLOGIA**

Os dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos de forma retrospectiva dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística-SAME do Centro de Tratamento e Pesquisa - A.C.Camargo Cancer Center da Fundação Antônio Prudente de São Paulo.

Os dados coletados dos 203 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 2).

Foram estudados os respectivos materiais devidamente arquivados em parafina no Departamento de Anatomia Patológica Centro de Tratamento e Pesquisa-A.C.Camargo Cancer Center da Fundação Antônio Prudente de São Paulo e que foram passíveis de confirmação diagnóstica.

A partir do material existente nos blocos de parafina, realizaram-se cortes para posterior coloração imunohistoquímica dos anticorpos SOX2 e ALDH1.

### **3.2.1 Diagnóstico**

Todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral, analisando-se os diversos aparelhos e sistemas, e exame locorregional, no qual a lesão primária era caracterizada segundo o seu aspecto, localização e extensão. A presença de linfonodos clinicamente metastáticos foi investigada através da palpação das regiões inguinais. O toque retal foi realizado para avaliação de possível infiltração da raiz do pênis e próstata.

A suspeita clínica foi confirmada sempre pela biópsia incisional de área periférica da lesão. O material de biópsia obtido foi fixado em formalina a 10% e incluído em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. Quando os pacientes já haviam sido biopsiados em outras instituições, as lâminas foram submetidas à revisão anatomopatológica sistemática.

### **3.2.2 Estadiamento**

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM. As metástases pulmonares foram investigadas através de radiografias de tórax realizadas nas incidências pósterio-anterior e perfil.

### **3.2.3 Procedimento Cirúrgico**

Todos os pacientes foram tratados por cirurgia. Os tumores foram excisados com margem macroscópica mínima de 2,0 cm. O tipo de cirurgia realizada variou de acordo com a extensão do tumor. Os procedimentos realizados foram: ressecção ampla, amputação parcial ou total do pênis. No último caso, os pacientes foram submetidos a uretostomia perineal.

O tratamento dos linfonodos regionais, quando necessário, foi à linfadenectomia inguinal ou ilioinguinal bilateral. A linfadenectomia ilioinguinal consistiu na ressecção em monobloco de linfonodos, vasos linfáticos e tecido aureolar de sustentação da cadeia ilíaca comum, externa e interna, do conteúdo da fossa obturadora e da região inguinal, conforme técnica preconizada no Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center (GENTIL et al. 1986).

Nas linfadenectomias inguinais, a cirurgia limitou-se a essa região, sendo ressecados os linfonodos superficiais e profundos.

#### **3.2.4 Seguimento dos Pacientes**

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais. As consultas foram realizadas mensalmente no primeiro semestre, e bimestrais no segundo. Do segundo ao terceiro ano de seguimento estas consultas passaram a ser trimestrais, sendo após o terceiro ano, realizadas anualmente.

Em todas as consultas, era realizado exame físico sistemático locorregional.

As radiografias de tórax eram realizadas anualmente ou na vigência de sintomas.

Os pacientes foram classificados a partir do seguimento em:

- a) vivos sem câncer,
- b) mortos pelo câncer ou por complicação do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias pós-cirurgia),
- c) mortos por outras causas,
- d) perdidos no seguimento.

### 3.2.5 Exame Patológico do Tumor Primário

Por se tratar de estudo retrospectivo, os protocolos de fixação e inclusão foram variáveis de acordo com a época. Os dados macroscópicos foram recuperados de laudos anatomopatológicos em arquivo. Todos os blocos foram recortados com secções novas e corados por HE.

Todas as lâminas foram revistas por três patologistas, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e Dra. Isabela Cunha do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center e pelo Dr. Antonio Cubilla, patologista paraguaio especialista em carcinoma peniano.

Os critérios usados para definir as variáveis anatomopatológicos foram:

- a) Espessura do tumor: Medida a partir da superfície até a infiltração da região mais profunda, com o auxílio de uma escala milimétrica, aplicada sobre o corte histológico. Foram então agrupados em 1) até 1 mm 2) de 1-5 mm e 3) maior que 5 mm.
- b) Grau de diferenciação histológica:
  - Grau I (bem diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, numerosas e visíveis pontes intercelulares, poucas mitoses, pequeno grau de anaplasia e evidente queratinização, com numerosas e visíveis pérolas córneas.
  - Grau II (moderadamente diferenciado): Caracterizado pela presença de células poligonais estratificadas, poucas pontes intercelulares, mitoses numerosas e atípicas, pleomorfismo nuclear evidente e pérolas córneas escassas ou ausentes.

- Grau III (pouco diferenciado): Caracterizado pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas, alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hipercromasia nuclear, com mitoses numerosas e atípicas.

Os tumores com diferentes características histológicas foram classificados segundo o aspecto predominante, exceto os tumores pouco diferenciados, nos quais, quando havia mais de 10% da área indiferenciada, foram classificados como grau III.

- c) Embolização vascular linfática: Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular de paredes delgadas, revestidas por células endoteliais desprovidas de fibras musculares lisas ou hemácias.
- d) Embolização vascular venosa: Caracterizada por células neoplásicas, livres ou agrupadas, no lúmen vascular com hemácias, revestimento endotelial e fibras musculares.

Os grupos “c” e “d” foram agrupados em um único grupo, como invasão angiolinfática ou linfovascular.

- e) Infiltração de corpo esponjoso ou cavernoso: Caracterizado por invasão por células neoplásicas dessas estruturas vistas ao microscópio, parcial ou totalmente.
- f) Infiltração da Uretra: Caracterizada quando a neoplasia invade o epitélio e/ou o córion subjacente.
- g) Invasão perineural: Caracterizada quando a neoplasia invade o espaço perineural.
- h) Tipo de invasão: (Padrão estabelecido segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989):

- Padrão tipo Deslocamento (pushing): Caracterizado quando as células tumorais invadem em grandes blocos celulares com interface tumor-hospedeiro bem delimitada.
  - Padrão tipo Infiltrante (infiltrating): Caracterizado por invasão em blocos de cordões sólidos de células tumorais que infiltram amplamente o estroma do órgão.
- i) Tipo Histológico (morfologia): Foram utilizados os critérios previamente descritos e divididos como grupos de risco conforme previamente publicado por GUIMARÃES et al. (2009) e agrupados em baixo risco (Warty, warty invasivo, papilar, condiloma gigante, pseudoglandular, cuniculatum, verrucoso, verrucoso invasivo, pseudo-hiperplásico, e as formas mistas destas variantes) e alto risco (demais morfologias).
- j) Padrão de crescimento: Dividido em horizontal ou superficial e vertical
- Horizontal: a neoplasia cresce superficialmente, com infiltração apenas das camadas mais superiores do epitélio. Apresenta maior extensão radial em comparação com a profundidade.
  - Vertical: a neoplasia tem maior eixo em direção a profundidade que diâmetro. Atinge as camadas profundas do epitélio e elementos subjacentes.

### **3.2.6 Técnica de TMA**

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, foram identificadas as lâminas histológicas referentes à peça cirúrgica (tumor peniano). Em virtude de haver, em vários casos, mais de uma lâmina representativa do tumor primário, todas elas foram revistas por três patologistas (Prof. Dr. Fernando Augusto

Soares, Dra. Isabela Werneck da Cunha e o Prof. Dr. Antonio Cubilla), selecionando-se aquela mais representativa da lesão.

Para construção do TMA (Anexo 3) o médico patologista selecionou nas lâminas de hematoxilina-eosina as áreas do tumor a serem amostradas nos blocos de parafina. Foram obtidos cilindros de 1 mm da área tumoral que foram montados em um novo bloco de parafina com posição bidimensional determinada e gravada por equipamento específico. Foram realizadas amostras em duplicata de cada caso, o que necessitou de dois blocos receptores. A partir deste novo bloco (BP-TMA) foram preparados cortes histológicos em lâminas polarizadas nas quais foram executadas as reações de imunistoquímica com os anticorpos do estudo, seguindo técnica padronizada no laboratório de patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

Um caso foi definido como adequado, quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro. Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes de cinco milímetros foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior. Realizou-se o controle do número de casos avaliáveis pela coloração de uma lâmina a cada 25 cortes pela contagem dos cilindros, quando presentes. O TMA foi considerado esgotado quando acima de 25% das amostras não se encontravam presentes nas lâminas.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópios comuns e os resultados classificados para cada reagente. Os resultados foram correlacionados às variáveis estudadas.

As reações de imunistoquímica para cada anticorpo foram realizadas em duas lâminas do TMA. Como dito anteriormente, há dois cilindros de cada tumor alocados no bloco de TMA, o que fez que as análises fossem feitas em quadruplicata.

Os cortes histológicos foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação em banho-maria, utilizando-se tampão EDTA + Tris, pH 9,0 por 40 minutos, deixando-se mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), com três trocas de 5 minutos cada. Após o bloqueio da peroxidase, também se fez o bloqueio de proteína (DAKO® Protein Block Serum-Free) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (conforme o Quadro 6), por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada, sendo incubadas, posteriormente, com NovoLink Max Polymer (Novocastra), por 30 minutos, à temperatura ambiente, passando em seguida por três lavagens de 5 minutos em PBS. As lâminas foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, DAKO®) e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck®). As reações foram realizadas em duas lâminas de TMA com intervalo de 60 cortes entre elas, garantindo que as células analisadas não fossem as mesmas. Procedeu-se então a montagem das lâminas em Entellan (MERCK, Germany).

Para todos os anticorpos testados foram realizadas lâminas controle da reação. Como controle positivo foi utilizado um tecido sabidamente com expressão da proteína a ser pesquisada. Foram realizadas duas lâminas de controle negativo. A primeira delas foi feita com a retirada do anticorpo primário e substituição por soro bovino fetal. O segundo controle negativo foi realizado com a retirada da reação do anticorpo secundário e substituição por soro contendo imunoglobulina do mesmo halotipo do anticorpo primário, mas da mesma espécie.

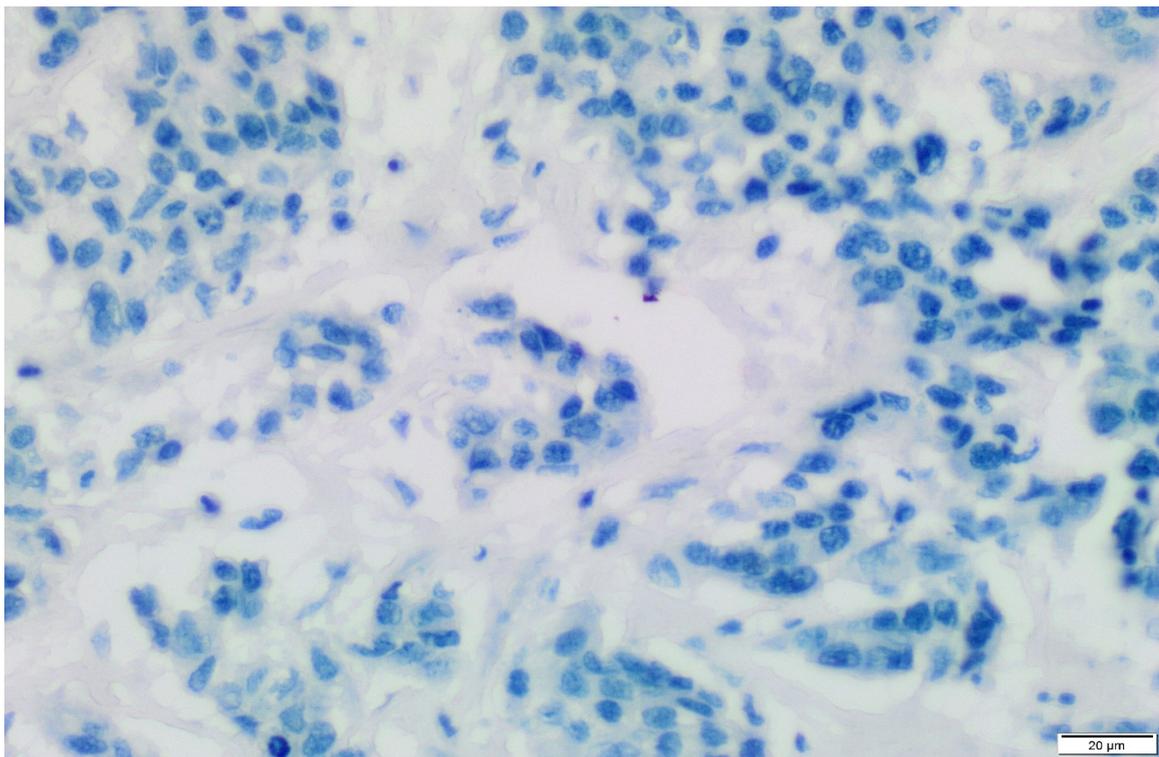
**Quadro 6** - Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
SOX2	SP 76	01:50	CELL MARQUE (SIGMA-ALDRICH)
ALDH1	SP 296	01:50	ABCAM

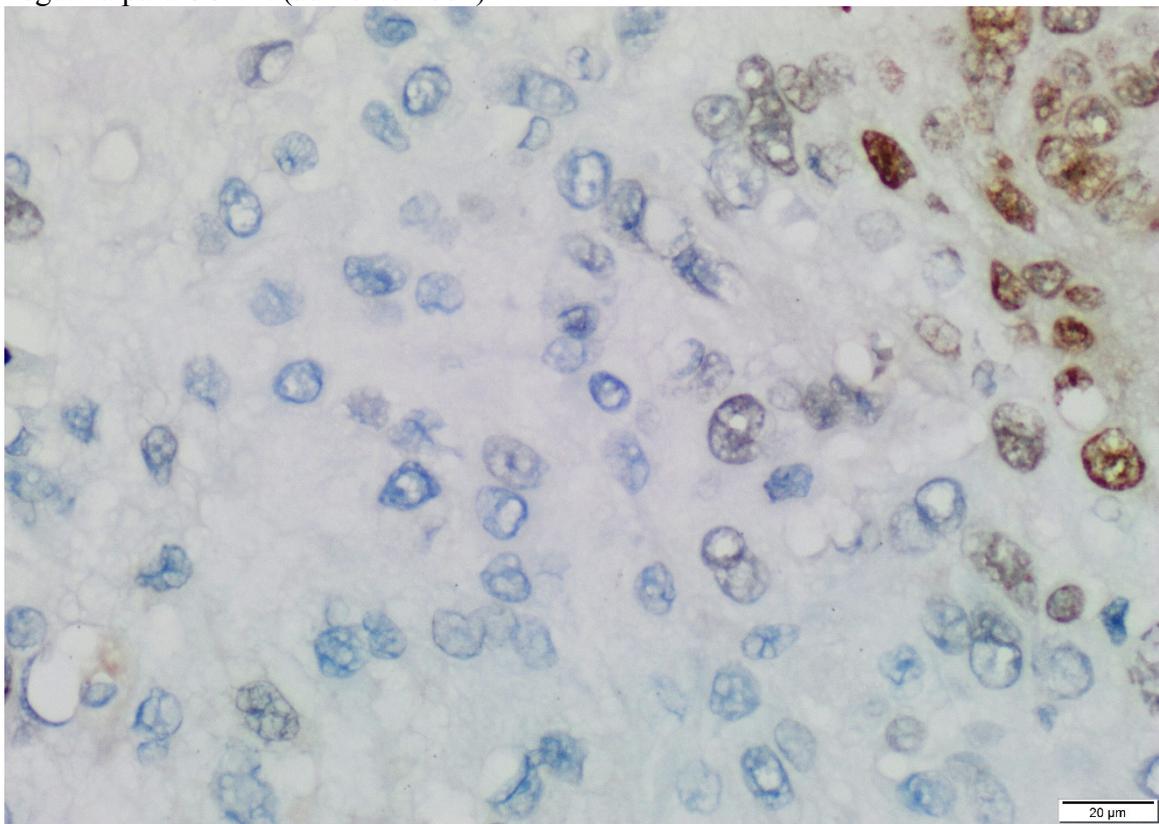
### 3.2.7 Interpretação das Reações Imunoistoquímicas

A análise da expressão das proteínas foi realizada por uma patologista (Isabela Werneck da Cunha) quantificando a marcação citoplasmática de ALDH1 e nuclear de SOX2, sem conhecimento dos dados clínicos dos pacientes.

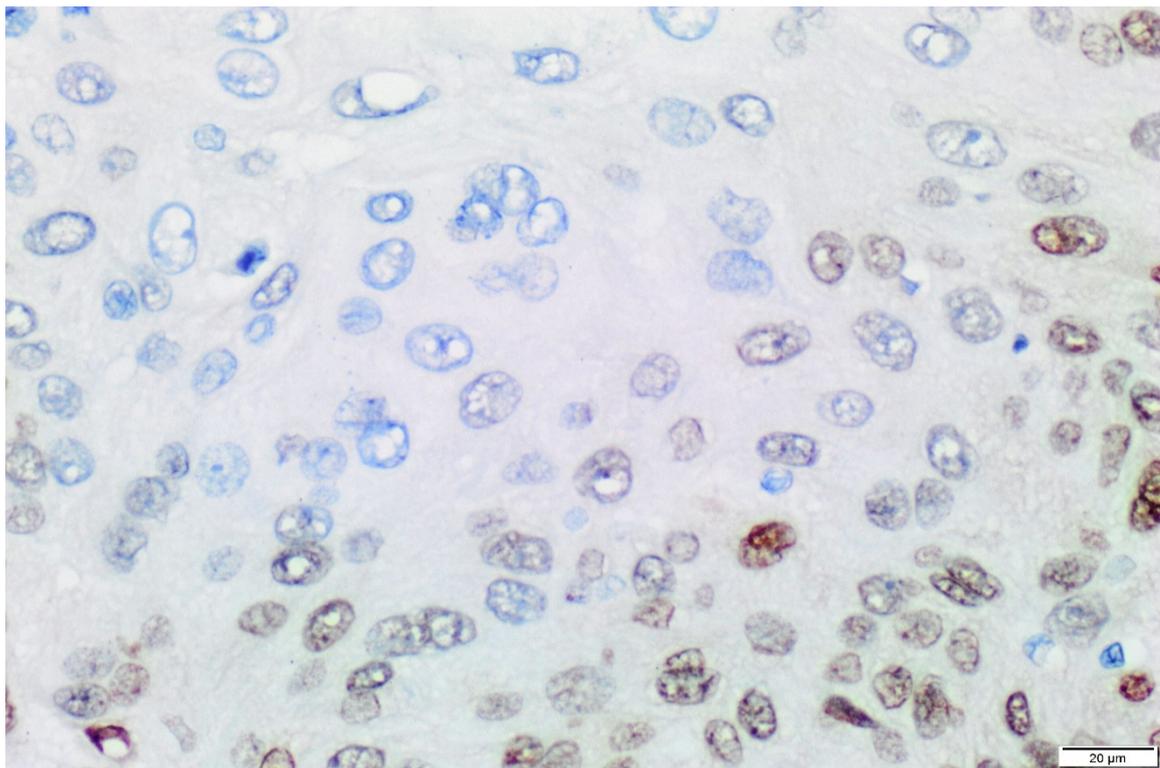
Devido a multiplicidades de metodologias utilizadas nos estudos relatados e escassez de trabalhos em tumores de pênis utilizando estes marcadores, bem como da porcentagem de células positivas mesmos em outros tumores, foi utilizada avaliação por quartis (0 1 -25% 26 – 50%, 51- 75% e > 76%) por ser essa a avaliação mais comum desses marcadores em outros tumores, ilustrados nas Figuras 4 a 8.



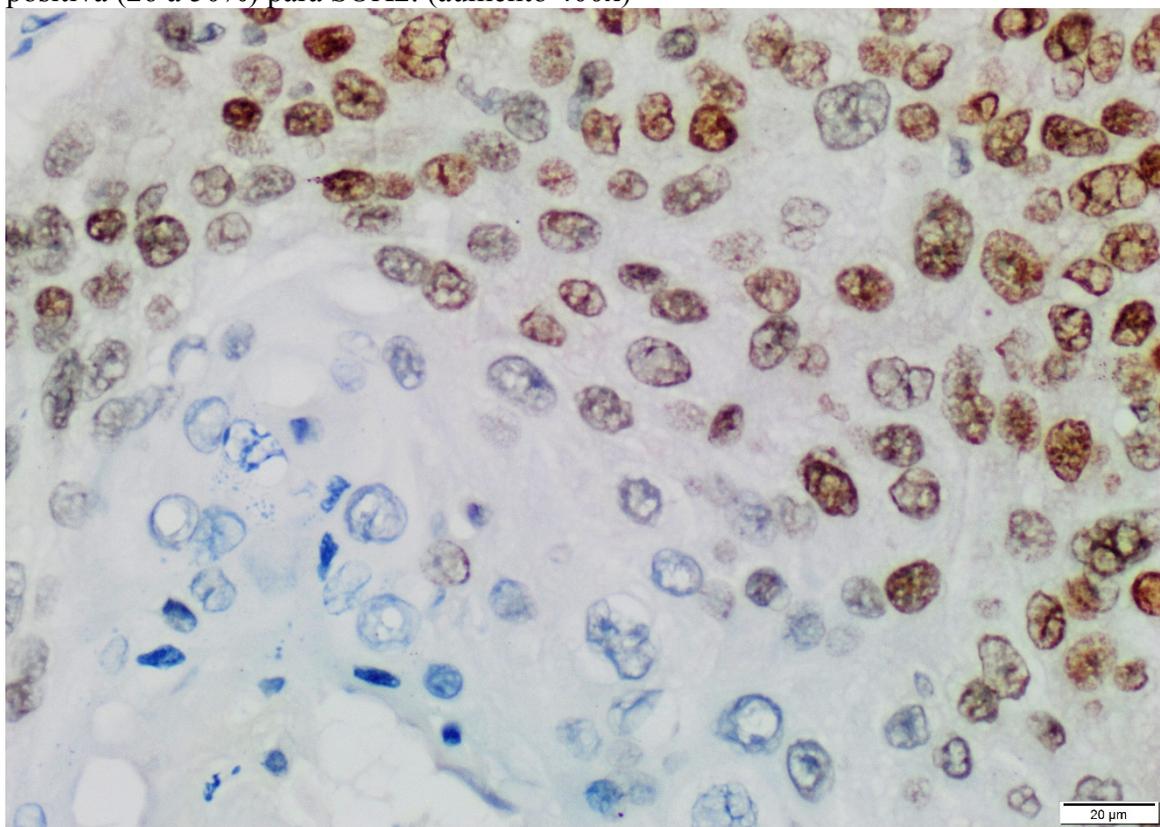
**Figura 4** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para SOX2. (aumento 400x)



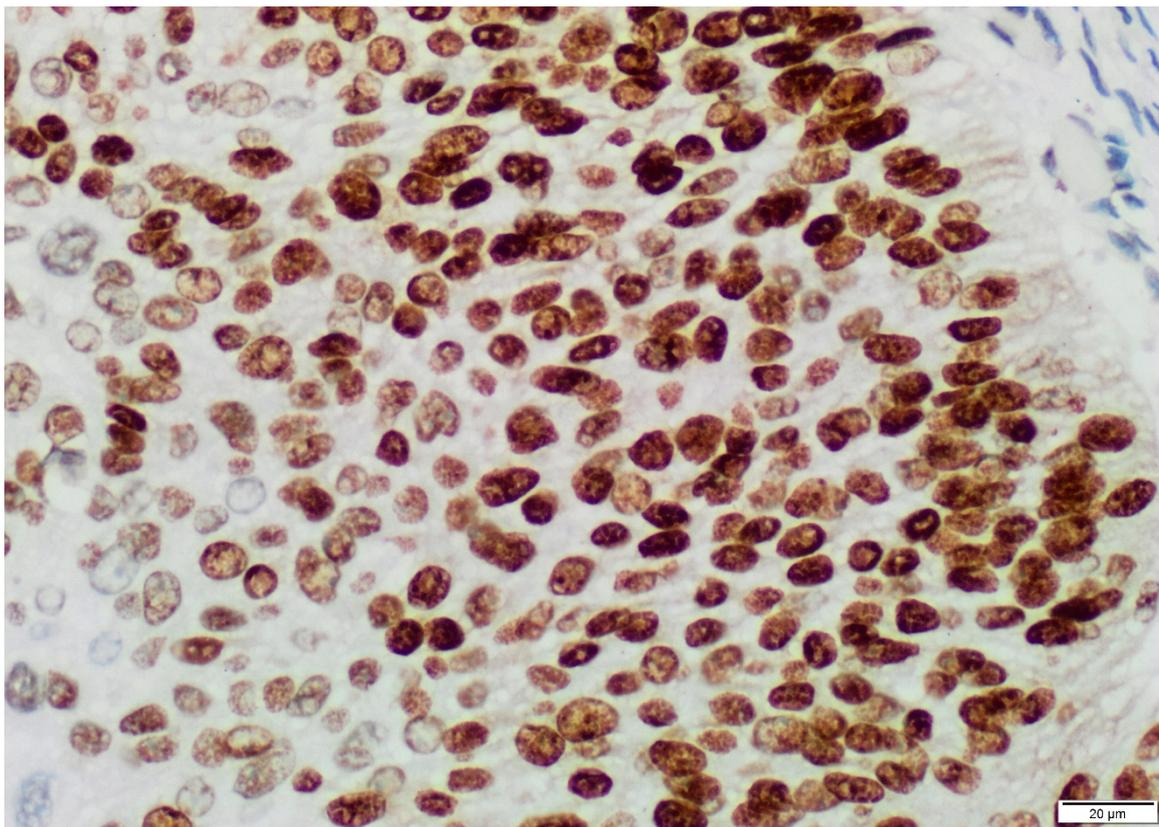
**Figura 5** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (1-25%) para SOX2. (aumento 400x)



**Figura 6** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (26 a 50%) para SOX2. (aumento 400x)



**Figura 7** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (51 a 75%) para SOX2. (aumento 400x)



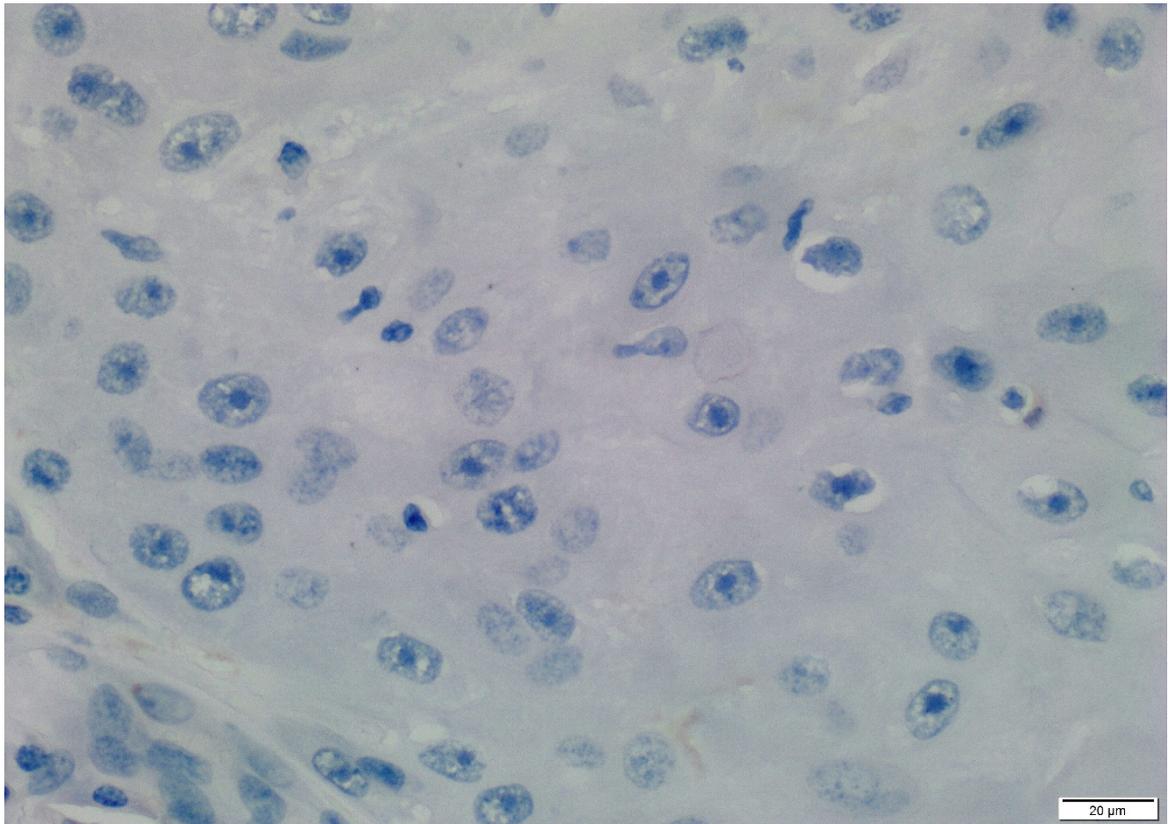
**Figura 8** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação positiva (acima de 75%) para SOX2. (aumento 400x)

A maior parte dos casos não apresentou imunorreatividade e menos de 10% apresentou reatividade acima de 25%, conforme demonstrado na Tabela 1.

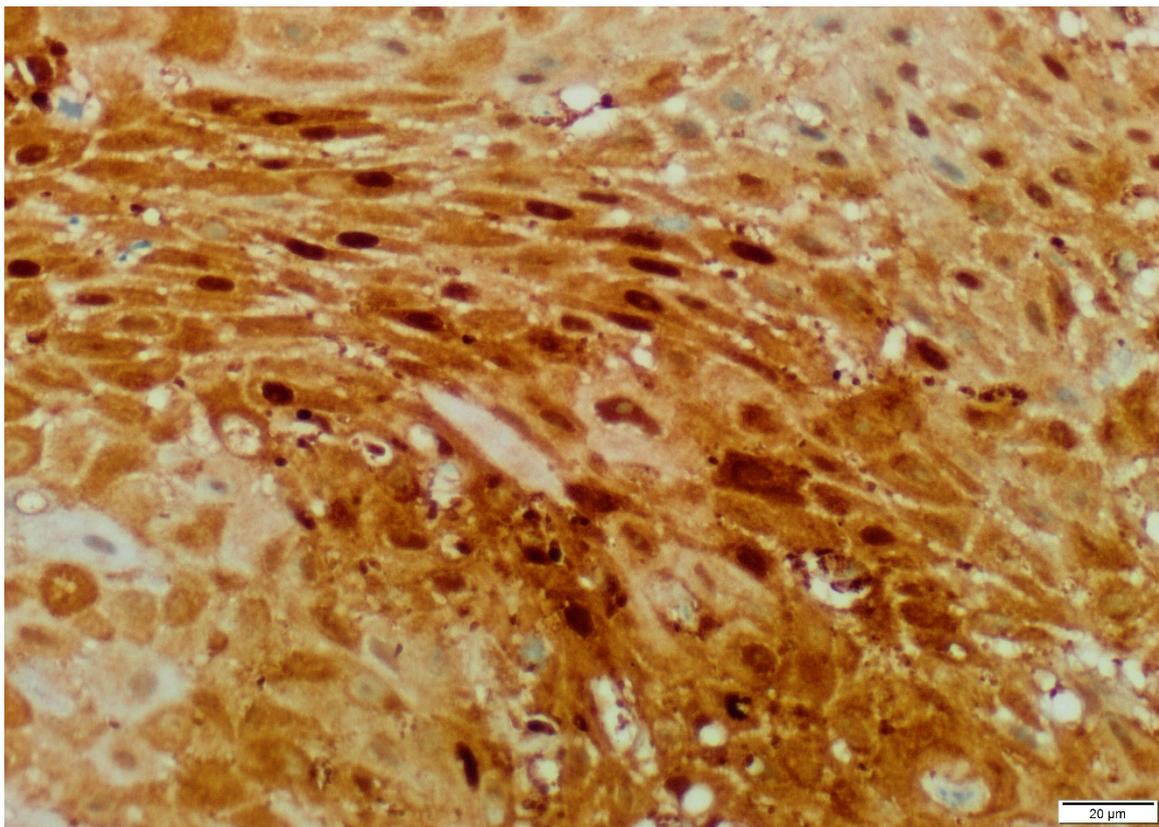
**Tabela 1** - Divisão de casos de acordo com a quantificação de marcação de SOX2.

MARCAÇÃO SOX 2	QUANTIDADE DE CASOS (%)
0	134 (66)
1 a 25%	49 (24,1)
26 a 50%	11 (5,4)
51 a 75%	7 (3,4)
> 76%	2 (1,0)

Como apenas 5 casos de ALDH1 apresentaram marcação, considerou-se positiva qualquer marcação citoplasmática. Nos casos de SOX2, houve variação na quantidade de marcação de área tumoral, com 90% dos casos divididos nos dois primeiros parâmetros, sendo então distribuídas em negativo (sem marcação) e positivo (qualquer marcação positiva), como ilustrado abaixo nas Figuras 9 e 10.



**Figura 9** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para ALDH1. (aumento 400x)



**Figura 10** - Fotomicrografia de carcinoma espinocelular do pênis com marcação negativa para ALDH1. (aumento 400x)

### 3.3 CASUÍSTICA

#### 3.3.1 Aspectos Demográficos e Clínicos

A Tabela 2 apresenta as características clínico-demográficas da população estudada. A idade dos 203 pacientes variou entre 22 e 87 com média de 54,9 e mediana de 54 anos (dp=12,7). Cento e cinquenta e um pacientes (74,4%) eram brancos e 52 (25,6%) não brancos.

Dos 203 pacientes 154 (75,9%) eram casados e 44 (21,7%) não casados (solteiros, separados, viúvos) e em 5 (2,5%) não havia informação. Antecedentes de doença venérea foi referida em 55 pacientes (27,1%); Cento e dezenove (58,6%) negavam antecedentes venéreos e não havia informação em 29 (14,3%) dos casos.

Na apresentação à primeira consulta 147 pacientes (72,4%) apresentavam o tumor do pênis intacto, enquanto 52 (25,6%) já tinham sido biopsiados previamente e quatro (2,0%) já haviam sido submetidos à amputação. Quase todos os pacientes referiram como uma das queixas a ferida (95,1%).

Apenas quarenta e um pacientes foram submetidos a postectomia, sendo em 32 (15,8%) a postectomia foi realizada em decorrência do tumor primário e em 9 casos (4,4%) esta foi realizada sem relação ao tumor primário. Cento e cinquenta e sete pacientes (77,3%) não a realizaram. Em cinco (2,5%) não havia a informação.

O tempo de evolução da doença até o diagnóstico variou de 1 a 240 meses com média de 17,7 meses (dp=29,4) e mediana de 7 meses, sendo agrupados para análise, em até 6 meses e mais de 6 meses de evolução.

**Tabela 2** - Frequência das variáveis demográficas e clínicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria / medidas	Freq. (%)
Idade	Até 60 anos	135 (66,5)
	> 60 anos	68 (33,5)
Estado civil	Casado	154 (75,9)
	Não casado	49 (24,1)
Raça	Branco	151 (74,4)
	Não branco	52 (25,6)
Antecedente venéreos	Não	119 (58,6)
	Sim	55 (27,1)
	Ignorado	29 (14,3)
Sinais e sintomas	Feridas + (feridas +outros)	193 (95,1)
	Outros não feridas	10 (4,9)
Postectomia	Não	157 (77,3)
	Não relacionada	8 (3,9)
	Relacionada	32 (15,8)
	Vida adulta	1 (0,5)
	Ignorado	5 (2,5)
Tempo de evolução (meses)	≤ 6 meses	94 (47,2)
	> 6 meses	105 (52,8)
Doenças previas relacionadas	Não	111 (54,7)
	Eritroplasia Queyrat	1 (0,5)
	Balanopostite crônica	2 (1,0)
	Fimose	80 (39,4)
	Ignorado	9 (4,4)
Primeira consulta	Biopsiado	52 (25,6)
	Amputado	4 (2,0)
	Intacto	147 (72,4)

De acordo com o estadiamento clínico T (AJCC7) oito (4,0%) apresentavam tumores T1a 10 (5,0%) T1b, 85 (42,5%) T2, 89 (44,5%) T3, 6 (3,0%) T4, sendo ignorado em 2 (1%) casos. Em relação ao estágio linfonodal, o número de casos N0, N1, N2, N3 e Nx foi respectivamente, 70 (35,0%); 30 (15,0%); 89 (44,5%); 6 (3,0%) e 5 (2,5%) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Distribuição da casuística de acordo com estadiamento clínico clinicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Freq. (%)
Estadiamento cT (AJCC7)	T1a	8 (4,0)
	T1b	10 (5,0)
	T2	85 (42,5)
	T3	89 (44,5)
	T4	6 (3,0)
	Tx	2 (1,0)
Estadiamento cN (AJCC7)	N0	70 (35,0)
	N1	30 (15,0)
	N2	89 (44,5)
	N3	6 (3,0)
	NX	5 (2,5)

### 3.3.2 Aspectos Cirúrgicos

Cento e onze (54,7%) pacientes foram submetidos à amputação parcial do pênis e 78 (38,4%) à amputação total. Em 6 casos foi realizada a emasculação (3,0%) 2 casos apenas biopsia excisional (1,0%) e em outros 4 (2,0%), postectomia. A maioria dos casos o tumor estava localizado em glândula e o índice de complicações relacionados a cirurgia do tumor primário foi de 25,6%, sendo a mais comum estenose de meato.

Em 31 (15,3%) pacientes foi realizado esvaziamento inguinal e em 64 (31,5%), esvaziamento ínguino-iliaco. Em 105 (51,7%) não se realizou esvaziamento inguinal, mas esse grupo de pacientes apresenta seguimento maior que 5 anos. Dos 98 pacientes submetidos à linfadenectomia, houve ao menos uma complicação pós-operatória em 82 (83,7%) casos, sendo as mais frequentes infecção, deiscência e necrose dos retalhos dermogordurosos, isolados ou em conjunto. Houve 7 (7,1%) casos de ruptura de vasos femorais e 28 (28,5%) casos de

linfedema de membros inferiores, geralmente associados à infecção e deiscência dos retalhos de pele. (Tabela 4).

**Tabela 4** - Distribuição da casuística de acordo com variáveis de esvaziamento ganglionar dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Freq. (%)
Tipo de esvaziamento ganglionar	(0) Não	105 (51,7)
	(1) Inguinal	31 (15,3)
	(2) Inguinoilíaco	64 (31,5)
	(3) Outros	3 (1,5)
Complicações relacionadas ao esvaziamento	Não houve complicação	14 (14,3)
	Houve complicação	82 (83,7)
	Ignorado	2 (2,0)

Entre esses 98 pacientes submetidos a linfadenectomia, foram dissecados em média de 14,1 por paciente (dp= 18,2) (variando de 3 a 77. Em 45 (22,2%) não foram encontradas metástases linfonodais à linfadenectomia, em 53 (26,1%) os linfonodos apresentavam acometimento neoplásico.

Considerando os 52 pacientes em que havia informação sobre a lateralidade dos linfonodos metastáticos, observou-se que 26 (50%) apresentavam metástases unilaterais e outros 26 (50%) bilaterais. Já em relação a topografia 28 (53,9%) estavam apenas na cadeia inguinal 22 (42,3%) inguinoilíaca e 2 (3,8%) apenas ilíaca. (Tabela 5).

De uma forma geral 150 (73,9%) pacientes foram classificados como negativos para metástases linfonodais (clínica e patologicamente) enquanto 53 (26,1%) pacientes foram classificados como positivos.

**Tabela 5** - Distribuição da casuística de acordo com avaliação linfonodal dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria / medidas	Freq. (%) / Medidas
Total de linfonodos positivos	= 0 (nenhum)	150 (73,9)
	≥ 1	53 (26,1)
Lateralidade do linfonodo positivo	Unilateral	26 (12,8)
	Bilateral	26 (12,8)
	Não se aplica	150 (73,9)
	Ignorado	1 (0,5)
Cadeia positiva	Inguinal	28 (14,5)
	Inguinal-ilíaco	22 (11,4)
	Ilíaco	2 (1,0)
	Não se aplica	141 (73,1)

### 3.3.3 Aspectos Anatomopatológicos

A principal variante histológica foi o CEC de alto risco (72,4%), seguido dos tipos cuniculatum, pseudoglandular e papilar. Houve apenas 3 casos (1,5%) com presença de margem cirúrgica positiva e os estádios patológicos T mais frequentes foram T2 (52,9%) e T3 (23,6%). O grau de diferenciação foi assim representado: 58 pacientes (28,6%) apresentavam tumor grau I (baixo grau); 63 pacientes (31,0%), tumor grau II (grau intermediário) e 80 (39,4%), tumor grau III (alto grau).

Dos 203 casos estudados, em 186 (91,6%) havia informação sobre a espessura tumoral, sendo destes 55 casos (27,1%) com espessura de até 5 mm, enquanto 131 casos (64,5%) espessura maior do que 5 mm.

A invasão angiolinfática foi constatada em 42 casos (20,7%) e estava ausente em 151 casos (74,4%) (10 casos (4,9%) não avaliáveis). Já a invasão perineural estava presente em 51 casos (25,1%), ausente em 141 (69,5%) e não avaliáveis em 11 (5,4%).

Foi observada a infiltração dos corpos cavernosos em 95 casos (46,8%) e a sua ausência em 69 casos (34,0%). Os casos sem informação totalizaram 39 (19,2%). A invasão do corpo esponjoso esteve presente em 121 casos (59,6%), enquanto a sua ausência foi identificada em cinquenta e quatro casos (26,6%), sendo 28 casos (13,8%) sem informação. A invasão uretral estava presente em 52 casos (25,6%) e ausente em 95 casos (46,8%), sendo 56 casos (27,6%) sem informação.

O tipo de invasão, uma variável relativamente recente, foi de deslocamento em 26,1% e em outros 69% a invasão foi infiltrante. A presença de HPV foi outro aspecto estudado, presente em 44 casos (21,7%). Sua ausência foi constatada em 147 casos (72,4%), com 12 casos (5,9%) sem informação (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição da casuística de acordo com variáveis anatomopatológicas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Freq. (%)
Histologia	Baixo risco	56 (27,6)
	Alto risco	147 (72,4)
Tipo de invasão (bordas)	Deslocamento	53 (26,1)
	Infiltrante	140 (69,0)
	Indeterminada	10 (4,9)
Grau	Baixo Grau	58 (28,6)
	Grau Intermediário	63 (31,0)
	Alto Grau	80 (39,4)
	Indeterminada	2 (1,0)
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	54 (26,6)
	Positivo	121 (59,6)
	Indeterminada	28 (13,8)
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	69 (34,0)
	Positivo	95 (46,8)
	Indeterminada	39 (19,2)

**Cont/Tabela 6**

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>Freq. (%)</b>
Infiltração de uretra	Negativo	95 (46,8)
	Positivo	52 (25,6)
	Indeterminada	56 (27,6)
Invasão angiolinfática	Negativo	151 (74,4)
	Positivo	42 (20,7)
	Indeterminada	10 (4,9)
Invasão perineural	Negativo	141 (69,5)
	Positivo	51 (25,1)
	Não avaliável	11 (5,4)
pT (AJCC7)	Tis	1 (0,5)
	Ta	1 (0,5)
	T1a	30 (15,7)
	T1b	5 (2,6)
	T2	101 (52,9)
	T3	45 (23,6)
	T4	2 (1,0)
	Tx	6 (3,1)
Espessura tumoral	Até 5 mm	55 (27,1)
	> 5 mm	131 (64,5)
	Indeterminada	17 (8,4)
Coilocitose (HPV)	Ausente	147 (72,4)
	Presente	44 (21,7)
	Indeterminada	12 (5,9)
Padrão de crescimento	Superficial	45 (22,2)
	Vertical	143 (70,4)
	Ignorado	15 (7,4)

### 3.3.4 Seguimento e Sobrevida

O tempo de seguimento variou de 0,1 a 452,8 meses com média de 124,8 (dp=105,5) e mediana de 99,6 meses. Em 29 pacientes (14,3%) houve recorrência tumoral. Em 21 casos (10,3%) locorregional e em 8 (3,9%) à distância. Ao final do seguimento, 83 (40,9%) pacientes estavam vivos sem doença, 6 (3,0%) vivo com

câncer 29 (14,3%) morreram em decorrência do câncer ou de complicação do tratamento, 79 (38,9%) faleceram por outras causas e 6 (3,0%) foram perdidos de seguimento (Tabela 7).

**Tabela 7** - Situação clínica dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano ao final da atualização dos dados.

<b>Variável</b>	<b>Categoria / medidas</b>	<b>Freq. (%) / Medidas</b>
Status	Vivo sem doença	83 (40,9)
	Vivo com doença	6 (3,0)
	Óbito por Câncer	29 (14,3)
	Óbito por outra causa	79 (38,9)
	Perdido de vista	6 (3,0)

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (mínimo, máximo e desvio padrão) para as numéricas.

Para verificar as associações entre marcadores e linfonodos (positivo versus negativo) em relação as variáveis categóricas do estudo em tabelas de contingência, o teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado e, em tabelas 2x2, quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5, o teste exato de Fisher foi adotado.

O tempo de seguimento considerado foi o período entre a data de início do tratamento até a data óbito ou da última informação quando censurado.

A técnica de Kaplan-Meier foi adotada para estimar cada uma das probabilidades de sobrevida global e doença específica de cada uma das variáveis do estudo. A diferença entre as curvas de sobrevida foi verificada através do teste de logrank (KAPLAN e MEIER 1972).

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos.

O modelo de regressão de COX foi aplicado para estimar os riscos relativos e respectivos intervalos de confiança de 95% para ocorrência de óbito ou óbito por câncer.

Os fatores prognósticos independentes foram estimados através do modelo de regressão de COX multivariado (ALTMAN 1991a e b).

Os possíveis fatores de risco independentes para ocorrência de linfonodos e também para marcador SOX2, estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) foram obtidos pelo modelo multivariado de Regressão Logística.

Para todas as análises multivariadas, considerou-se nível de significância de 10% para inclusão das variáveis ao modelo, através da técnica “*Backward Selection*” (HOSMER e STANLEY 1989).

O programa STATA versão 10.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

(Ref: STATA Corp. 2007. Stata Statistical Software: Release 10.0. College Station, Texas: Stata Corporation).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS**

#### **5.1.1 Imunoistoquímica de ALDH1**

- **Análise Descritiva**

Como foram encontrados apenas 5 pacientes com marcação positiva do marcador ALDH1, optamos por realizar uma análise descritiva, separando os casos entre positivos (considerando qualquer intensidade de positividade) e negativos. Iniciamos com as variáveis clínico-demográficas, como pode ser visto na Tabela 8.

**Tabela 8** - Frequência das variáveis demográficas e clínicas com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria / medidas	Número de casos/ Medidas
Idade	Até 60 anos	4
	> 60 anos	1
Estado civil	Casado	5
	Não casado	0
Raça	Branco	3
	Pardo	2
Antecedente venéreos	Não	4
	Sim	1
Sinais e sintomas	Feridas	2
	Feridas + Outros sintomas	3
Tempo de evolução (meses)	≤ 6 meses	4
	> 6 meses	1
Doenças previas relacionadas	Não	3
	Fimose	2
Postectomia	Não	2
	Não relacionada	1
	Relacionada	2
Primeira consulta	Biopsiado	2
	Intacto	3

Na sequência, descrevemos a relação de ALDH1 com variáveis de estadiamento clínico, com destaque para a presença de linfonodos palpáveis e acometimento da glândula em todos os 5 casos (Tabela 9).

**Tabela 9** - Frequência das variáveis estadiamento clínico e cirurgia do tumor primário com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Número de casos
Estadiamento T (AJCC7)	T1b	3
	T2	2
Estadiamento N (AJCC7)	N2	5
Cirurgia	Amputação parcial	4
	Amputação total	1
HPV	Ausente	4
	Presente	1
Complicações da cirurgia	Nenhum	5
Localização do tumor	Glande	1
	Glande + outra região	4

Comparando os dados anatomopatológicos do tratamento do tumor primário temos maior prevalência de tumores do tipo alto risco histológico, grau mais agressivo, maior espessura, e com bordas de padrão infiltrante. (Tabela 10).

**Tabela 10** - Frequência das variáveis anatomopatológicas com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano.

<b>Variável</b>	<b>Categoria / medidas</b>	<b>Número de casos/ Medidas</b>
Tipo histológico	Baixo risco	1
	Alto risco	4
Tipo de invasão (Bordas)	Deslocamento	1
	Infiltrante	4
Margem	Negativa	5
	Positiva	0
Diferenciação	Baixo Grau	1
	Grau Intermediário	1
	Alto Grau	3
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	2
	Positivo	3
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	1
	Positivo	2
	Não avaliável	2
Infiltração de Uretra	Negativo	1
	Positivo	1
	Não avaliável	3
Invasão angiolinfática	Negativo	3
	Positivo	2
Invasão perineural	Negativo	3
	Positivo	2
Estadiamento pT (AJCC7)	T1b	1
	T2	3
	T3	1
Espessura tumoral	Até 5 mm	1
	> 5 mm	4
SOX2	Negativo	1
	Positivo	4

Apesar de os 5 pacientes estarem com linfonodos inguinais palpáveis na época do diagnóstico do câncer de pênis, foi realizado linfadenectomia inguinal em 3 desses pacientes com os seguintes resultados: o total de linfonodos examinados foi 120, sendo que em dois dos três pacientes havia linfonodos positivos. Como complicação houve ruptura de vasos ilíacos em um caso, não havendo nenhuma complicação nos outros 2 casos. (Tabela 11).

**Tabela 11** - Distribuição da casuística de acordo esvaziamento linfonodal com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria / medidas	Número de casos/ Medidas
Tipo de esvaziamento ganglionar	(0) Não	2
	(2) Inguinoilíaco	3
Lateralidade do esvaziamento	Unilateral	2
	Bilateral	1
	Não se aplica	2
Complicações relacionadas ao esvaziamento	Não	2
	Ruptura de vasos	1
	Não se aplica	2
Total de linfonodos examinados	= 0 (nenhum)	2
	≥ 1	3
Total de linfonodos positivos	= 0 (nenhum)	3
	≥ 1	2
Lateralidade do linfonodo positivo	Unilateral	2
	Não se aplica	3
Cadeia positiva	Inguinal-ilíaco	2
	Não se aplica	3

Avaliando o prognóstico desses 5 casos com marcação positiva para ALDH1, houve um caso de recidiva local 2 meses após a linfadenectomia, que foi operada. A sobrevida global para esses 5 casos foi de 77,8% (5 anos) e 51,8 (10

anos) e a sobrevida câncer específica e livre de doença foi 77,8% (5 anos) e 77,8% (10 anos). (Tabela 12).

**Tabela 12** - Situação clínica com imunorreatividade positiva de ALDH1 (5 pacientes) ao final da atualização dos dados.

<b>Variável</b>	<b>Categoria / medidas</b>	<b>Número de casos/ Medidas</b>
Status	Vivo sem doença	1
	Vivo com doença	1
	Óbito por Câncer	1
	Óbito por outra causa	2

### **5.1.2 Imunoistoquímica de SOX2**

Utilizando a divisão dos grupos entre negativo e positivo (como explicado na metodologia), a maior parte da nossa amostra foi negativo para a marcação de SOX2 (66%). Foram comparados os valores de expressão de SOX2 com as variáveis clínico-demográficas e encontramos associação estatisticamente significativa para estado civil ( $p=0,008$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Imunorreatividade de SOX2 segundo variáveis clínico-demográficas em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Marcação		p-valor
		Negativa	Positiva	
		Freq.(%)		
Faixa etária (anos)	≤ 60	86 (63,7)	49 (36,3)	0,328
	> 60	48 (70,6)	20 (29,4)	
Estado civil	Casado	94 (61,0)	60 (39,0)	<b>0,008</b>
	Solteiro+ viúvo	40 (81,6)	9 (18,4)	
Raça	Branco	99 (65,6)	52 (34,4)	0,819
	Não branco	35 (67,3)	17 (32,7)	
Antecedente venéreos	Não	74 (62,2)	435 (37,8)	0,262
	Sim	39 (70,9)	16 (29,1)	
Tempo de evolução (meses)	≤ 6 meses	64 (68,1)	30 (31,9)	0,620
	> 6 meses	68 (64,8)	37 (35,2)	
Estadiamento cT	T1+T2	65 (63,1)	38 (36,9)	0,431
	T3 +T4	65 (68,4)	30 (31,6)	
Estadiamento cN	N negativo	42 (60,0)	28 (40,0)	0,215
	N positivo	86 (68,8)	39 (31,2)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Quando comparado com variáveis anatomopatológicas, houve associação estatisticamente significativa para padrão de crescimento ( $p < 0,001$ ), infiltração de corpo esponjoso ( $p = 0,025$ ) e uretra ( $p = 0,021$ ), além de marginalmente significativo para pT (AJCC7) ( $p = 0,059$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Imunorreatividade de SOX2 segundo variáveis anatomopatológicas em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Marcação		p-valor
		Negativa	Positiva	
		Freq.(%)		
Padrão de crescimento	Superficial	20 (44,4)	25 (55,6)	<b>&lt;0,001</b>
	Vertical	105 (73,4)	38 (26,6)	
Histologia	Baixo risco	36 (64,3)	20 (35,7)	0,749
	Alto risco	98 (66,7)	49 (33,3)	
Tipo de invasão (Bordas)	Deslocamento	33 (62,3)	20 (37,7)	0,304
	Infiltrante	98 (70,0)	42 (30,0)	
Diferenciação	Baixo Grau	35 (60,3)	23 (39,7)	0,407
	Grau Intermediário	42 (66,7)	21 (33,3)	
	Alto Grau	57 (71,2)	23 (28,8)	
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	28 (51,8)	26 (48,2)	<b>0,025</b>
	Positivo	84 (69,4)	37 (30,6)	
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	43 (62,3)	26 (37,7)	0,503
	Positivo	64 (67,4)	31 (32,6)	
Infiltração de uretra	Negativo	55 (57,9)	40 (42,1)	<b>0,021</b>
	Positivo	40 (76,9)	12 (23,1)	
Invasão angiolinfática	Negativo	100 (66,2)	51 (33,8)	0,525
	Positivo	30 (71,4)	12 (28,6)	
Invasão perineural	Negativo	91 (64,5)	50 (35,5)	0,194
	Positivo	38 (74,5)	13 (25,5)	
Estadiamento pT (AJCC7)	Tis +Ta +T1a	88 (63,8)	50 (36,2)	<b>0,059</b>
	+T1b+T2			
	T3 + T4	37 (78,7)	10 (21,3)	
Estadiamento pN (AJCC7)	N negativo	96 (64,0)	54 (36,0)	0,309
	N positivo	38 (71,7)	15 (28,3)	
Espessura tumoral	Até 5 mm	35 (63,6)	20 (36,4)	0,378
	> 5 mm	92 (70,2)	39 (29,8)	
HPV	Ausente	94 (63,9)	53 (36,1)	0,281
	Presente	32 (72,7)	12 (27,3)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

\*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

## 5.2 AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASES LINFONODAIS

### 5.2.1 Análise Univariada

Dentre as variáveis clínico-demográficas avaliadas, as que se associaram com a presença de metástase linfonodal na análise univariada foi o estadiamento clínico N ( $p=0,001$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Status linfonodal segundo variáveis clínicas e demográficas dos 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Linfonodos		p-valor
		Negativos	Positivos	
		Freq.(%)		
Faixa etária (anos)	≤ 60	95 (70,4)	40 (29,6)	0,108
	> 60	55 (80,9)	13 (19,1)	
Estado civil	Casado	119 (77,3)	35 (22,7)	<b>0,052</b>
	Solteiro+ viúvo	31 (63,3)	18 (36,7)	
Raça	Branco	113 (74,8)	38 (25,2)	0,602
	Não branco	37 (71,2)	15 (28,8)	
Antecedente venéreos	Não	87 (73,1)	32 (26,9)	0,763
	Sim	39 (70,9)	16 (29,1)	
Tempo de evolução	≤ 6 meses	67 (71,3)	27 (28,7)	0,431
	> 6 meses	80 (76,2)	25 (23,8)	
Estadiamento cT	T1+T2	79 (76,7)	24 (23,3)	0,510
	T3 +T4	69 (72,6)	26 (27,4)	
Estadiamento cN	N negativo	65 (92,9)	5 (7,1)	<b>&lt; 0,001</b>
	N positivo	81 (64,8)	44 (35,2)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

Dentre as variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas as seguintes associaram-se significativamente com a presença de metástases linfonodais na análise univariada: a diferenciação do tumor primário ( $p<0,001$ ), invasão perineural ( $p<0,001$ ), invasão angiolinfática ( $p=0,002$ ), o tipo histológico ( $p=0,006$ ), a infiltração de corpos cavernosos ( $p=0,014$ ) e a espessura tumoral ( $p=0,036$ ). A associação entre expressão de SOX2 e metástase nos linfonodos não foi significativa ( $p=0,309$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16** - Distribuição da casuística de acordo com linfonodos positivos (não/sim).

Variável	Categoria	Linfonodos		p-valor
		Negativos	Positivos	
		Freq.(%)		
Padrão de crescimento	Superficial	33 (73,3)	12 (26,7)	0,936
	Vertical	104 (72,7)	39 (27,3)	
Histologia	Baixo risco	49 (87,5)	7 (12,5)	<b>0,006</b>
	Alto risco	101 (68,7)	46 (31,3)	
Tipo de invasão (bordas)	Deslocamento	44 (83,0)	9 (17,0)	0,055
	Infiltrante	97 (69,3)	43 (30,7)	
Diferenciação	Baixo Grau	57 (98,3)	1 (1,7)	<b>&lt; 0,001</b>
	Grau Intermediário	45 (71,4)	18 (28,6)	
	Alto Grau	46 (57,5)	34 (42,5)	
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	39 (72,2)	15 (27,8)	0,591
	Positivo	92 (76,0)	29 (24,0)	
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	57 (82,6)	12 (17,4)	<b>0,014</b>
	Positivo	62 (65,3)	33 (34,7)	
Infiltração de uretra	Negativo	74 (77,9)	21 (22,1)	0,161
	Positivo	35 (67,3)	17 (32,7)	

Cont/ Tabela 16

Variável	Categoria	Linfonodos		p-valor
		Negativos Freq.(%)	Positivos Freq.(%)	
Invasão angiolinfática	Negativo	119 (78,8)	32 (21,2)	<b>0,002</b>
	Positivo	23 (54,8)	19 (45,2)	
Invasão perineural	Negativo	120 (85,1)	21 (14,9)	<b>&lt; 0,001</b>
	Positivo	22 (43,1)	29 (56,9)	
Estadiamento pT (AJCC7)	Tis +Ta +T1a +T1b+T2	109 (79,0)	29 (21,0)	0,219
	T3 + T4	33 (70,2)	14 (29,8)	
Espessura tumoral	Até 5 mm	46 (83,6)	9 (16,4)	<b>0,036</b>
	> 5 mm	90 (68,7)	41 (31,3)	
HPV	Ausente	104 (70,8)	43 (29,2)	0,250
	Presente	35 (79,6)	9 (20,4)	
Expressão de SOX2	Negativa	96 (71,6)	38 (28,4)	0,309
	Positiva	54 (78,3)	15 (21,7)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

\*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

### 5.2.2 Análise Multivariada

A lista das variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada e aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 são listadas na Tabela 17.

**Tabela 17** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise p até 0,20.

Variável	p(x <sup>2</sup> )
Invasão Perineural	<0,001
Estádio cN	<0,001
Grau de Diferenciação	<0,001
Invasão angiolinfática	0,002
Histologia	0,006
Infiltração de corpos cavernosos	0,014
Espessura tumoral	0,036
Estado civil	0,055
Tipo de invasão	0,055

Conforme resultados obtidos pelo modelo de regressão Logística multivariado (Tabela 18), as variáveis possíveis fatores de risco INDEPENDENTES para ocorrência de linfonodos positivos estimados para este estudo foram:

- ✓ Estadiamento N (AJCC7) com N+ mostrou risco de aproximadamente 5 vezes mais chance do que os com N0.
- ✓ Invasão perineural tem quase 8 vezes mais chance do que os casos com ausência dos mesmos.

**Tabela 18** - Estimativa dos possíveis fatores de risco independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão logística para ocorrência de linfonodos positivos.

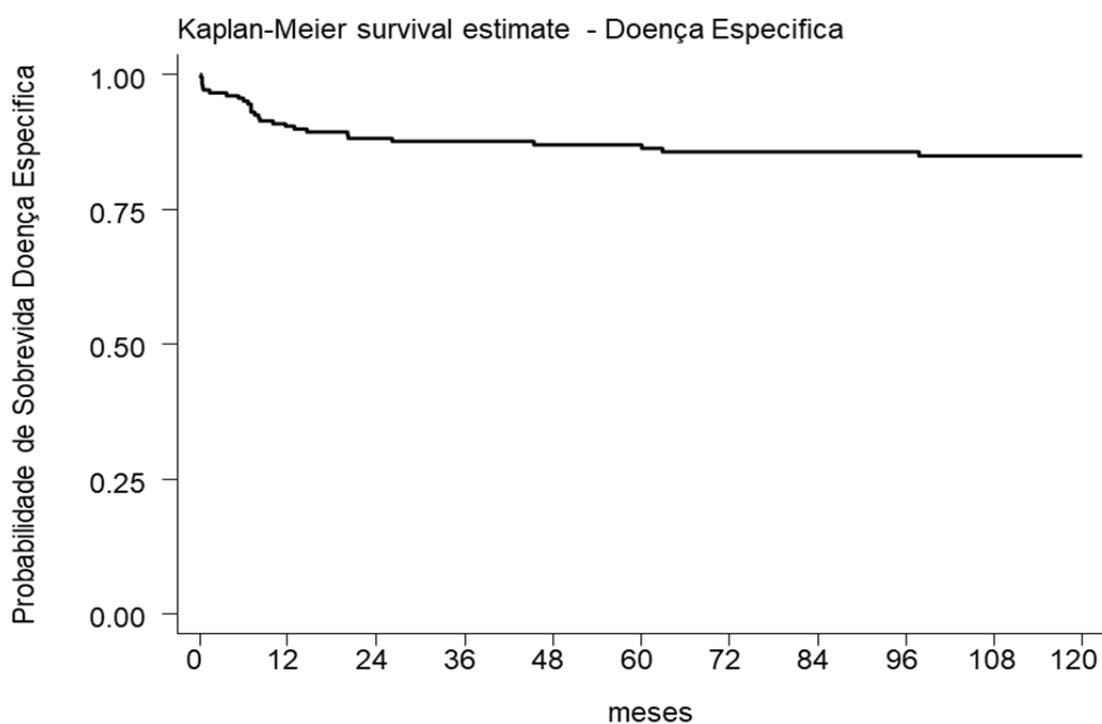
Variável	Categoria	N	RR (95%IC) multivariado
Estadiamento N (AJCC7)	N0	70	1,0 (ref.)
	N+	125	4,73 (1,67 – 13,43)
Invasão perineural	Negativo	141	1,0 (ref.)
	Positivo	51	7,50 (3,45 – 16,33)

## 5.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

### 5.3.1 Sobrevida Câncer Específica

- Análise univariada

A taxa de sobrevida câncer específica em 10 anos da população estudada foi de 84,6%, como mostrado na Figura 11.



**Figura 11** - Curva de sobrevida câncer específica para os 203 pacientes portadores de carcinoma espinocelular do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, a que influenciou significativamente a sobrevida câncer específica foi o estadiamento clínico N ( $p < 0,012$ ) (Tabela 19).

**Tabela 19** - Probabilidade de Sobrevida Doença Específica de acordo com variáveis demográficas, clínicas e de estadiamento em 203 pacientes com carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida doença específica (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Probabilidade sobrevida câncer específica		87,0	84,6	
Idade	Até 60 anos	83,5	81,6	0,054
	> 60 anos	93,6	90,3	
Estado civil	Casado	88,3	87,4	0,130
	Solteiro + viúvo	82,5	74,1	
Raça	Branco	87,4	85,5	0,685
	Não branco	85,7	82,0	
Antecedente venéreos	Não	86,6	84,0	0,676
	Sim	87,0	87,0	
Tempo de evolução (meses)	≤ 6 meses	85,6	84,1	0,688
	> 6 meses	87,7	84,5	
Estadiamento cT	T1 +T2	92,7	88,4	0,115
	T3 +T4	83,4	83,4	
Estadiamento cN	N0	95,7	93,6	0,012
	N+	83,5	80,9	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Dentre as variáveis anatomopatológicas e que influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica estão: padrão de crescimento tumoral ( $p=0,032$ ), grau de diferenciação histológica ( $p<0,001$ ), infiltração de corpos cavernosos ( $p<0,001$ ), invasão angiolinfática ( $p=0,004$ ), invasão perineural ( $p<0,001$ ), espessura tumoral ( $p=0,031$ ), estadiamento pT ( $p=0,008$ ) e metástase linfonodal ( $p<0,001$ ). A expressão de SOX2 ( $p=0,327$ ) e ALDH1 ( $p=0,547$ ) não influenciaram significativamente a sobrevida câncer específica (Tabela 20).

**Tabela 20** - Probabilidade acumulada de sobrevida câncer específica em 5 e 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoexpressão de SOX2 e ALDH1 em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Doença Específica (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Padrão de crescimento	Superficial	95,3	95,3	0,032
	Vertical	82,9	80,8	
Histologia	Baixo risco	88,9	88,9	0,619
	Alto risco	86,1	82,9	
Tipo de invasão (bordas)	Deslocamento	88,4	83,1	0,829
	Infiltrante	85,4	84,3	
Margem	Negativa	86,6	84,2	0,376
	Positiva	100,0	100,0	
Diferenciação	Baixo Grau	96,5	96,5	<0,001
	Grau Intermediário	91,1	88,4	
	Alto Grau	76,1	72,0	
Diferenciação (com agrupamento)	Baixo Grau	96,5	96,5	0,041
	Grau Intermediário + Alto Grau	82,7	79,3	
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	92,0	85,7	0,278
	Positivo	82,7	81,4	
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	96,9	96,9	<0,001
	Positivo	76,6	73,2	
Infiltração de Uretra	Negativo	89,1	87,6	0,071
	Positivo	76,9	73,8	
Invasão angiolinfática	Negativo	90,9	87,9	0,004
	Positivo	71,6	71,6	
Invasão perineural	Negativo	91,2	89,0	<0,001
	Positivo	73,2	69,3	

Cont/ Tabela 20

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Doença Específica (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Estadiamento pT (AJCC7)	Tis +Ta +T1a +T1b	97,1	97,1	0,008
	T2	90,8	87,9	
	T3 + T4	77,0	73,6	
Estadiamento pN	N0	95,2	93,2	<0,001
	N+	59,5	55,3	
Espessura tumoral	Até 5 mm	94,3	92,0	0,031
	> 5 mm	82,9	80,2	
HPV	Ausente	85,6	84,6	0,869
	Presente	87,7	84,4	
SOX2	Negativo	84,7	83,2	0,327
	Positivo	91,1	87,4	
ALDH1	Negativo	87,2	84,8	0,547
	Positivo	77,8	77,8	

p-valor obtido pelo teste de logrank

pT (AJCC7) = agrupando Tis +Ta +T1a +T1b (37 casos) ; T3+T4 (47 casos)

- Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 21).

**Tabela 21** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	p-valor
Metástase linfonodal	<0,001
Grau de diferenciação	<0,001
Invasão perineural	<0,001
Infiltração de corpo cavernoso	<0,001
Invasão angiolinfática	0,004
Estádio patológico T	0,008
Estádio clínico N	0,012
Espessura tumoral	0,031
Padrão de crescimento	0,032
Estado civil	0,054
Idade	0,071
Infiltração da uretra	0,115
Estádio clínico T	0,13

Conforme resultados obtidos pelo modelo de regressão de COX multivariado, as variáveis possíveis fatores prognósticos INDEPENDENTES para óbito câncer específico estimados para este estudo foi somente presença de linfonodos positivos, que tem quase 9 vezes mais chance de óbito que os casos com ausência do mesmo, conforme Tabela 22.

**Tabela 22** - Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX para Óbito Específico Câncer.

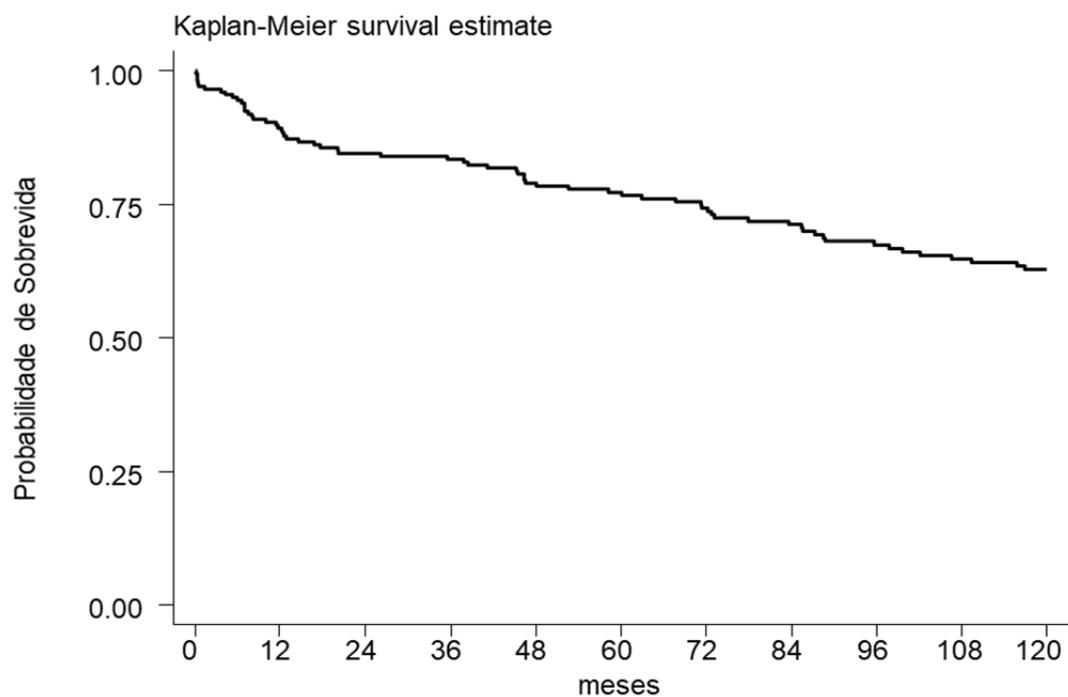
Variável	Categoria	N	RR (95%IC) multivariado
Linfonodos positivos	Não	150	1,0 (ref.)
	Sim	53	8,63 (3,94 – 8,92)

Portanto somente presença de linfonodos positivos, mostrar ser fator prognóstico independentes para óbito câncer específico, neste estudo.

### 5.3.2 Sobrevida Global

- Análise univariada

A taxa de sobrevida Global em 10 anos da população estudada foi de 62,9%, como mostrado na Figura 12.



**Figura 12** - Curva de sobrevida Global para os 203 pacientes portadores de carcinoma epidermóide do pênis.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas, as que influenciaram significativamente a sobrevida global foram faixa etária ( $p < 0,001$ ), estado civil ( $p < 0,001$ ), estadiamento cT ( $p = 0,027$ ) (Tabela 23).

**Tabela 23** - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 10 anos de acordo com variáveis clínicas em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Probabilidade sobrevida	Global (todos os casos)	77,3	62,9	
Idade	Até 60 anos	80,3	71,5	<0,001
	> 60	72,2	47,6	
Estado civil	Casado	81,1	69,4	0,001
	Solteiro + viúvo	65,7	42,0	
Raça	Branco	76,8	61,6	0,239
	Não branco	78,9	67,0	
Antecedente venéreos	Não	77,4	66,5	0,808
	Sim	73,7	48,2	
Tempo de evolução (meses)	Até 6 meses	75,5	66,0	0,412
	> 6 meses	78,2	58,8	
Estadiamento cT	T1+T2	82,4	70,1	0,027
	T3 +T4	76,2	58,5	
Estadiamento cN	N negativo	86,5	71,7	0,061
	N positivo	73,8	60,8	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Dentre as variáveis anatomopatológicas que influenciaram significativamente a sobrevida Global estão: grau de diferenciação histológica (p=0,019), infiltração de corpo cavernoso (p=0,006), infiltração de uretra (p=0,005), invasão angiolinfática (p=0,008), invasão perineural (p<0,001), estadiamento pT (p=0,018), espessura tumoral (p=0,002), presença de metástase linfonodal (p<0,001). A imunexpressão de SOX2 e ALDH1 não influenciaram essa sobrevida (Tabela 24).

**Tabela 24** - Probabilidade acumulada de Sobrevida Global em 5 e 10 anos de acordo com variáveis anatomopatológicas e imunoistoquímicas em 203 pacientes portadores de carcinoma peniano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Padrão de crescimento	Crescimento superficial	87,7	75,9	0,154
	Crescimento vertical	71,6	56,2	
Histologia	Baixo risco	83,1	68,8	0,283
	Alto risco	75,1	60,5	
Tipo de invasão (Bordas)	Deslocamento	84,4	70,0	0,322
	Infiltrante	72,7	59,9	
Margem	Negativa	77,1	63,4	0,123
	Positiva	80,0	60,0	
Diferenciação	Baixo Grau	89,1	80,6	0,019
	Grau Intermediário	77,2	60,5	
	Alto Grau	68,0	50,2	
Diferenciação	Baixo Grau	89,1	80,6	0,012
	Grau Intermediário + Alto Grau	72,1	54,5	
Infiltração de corpo esponjoso	Negativo	76,9	63,5	0,412
	Positivo	77,5	61,2	
Infiltração de corpos cavernosos	Negativo	87,8	80,6	0,006
	Positivo	66,9	51,9	
Infiltração de uretra	Negativo	82,4	76,0	0,005
	Positivo	64,2	40,8	
Invasão angiolinfática	Negativo	81,6	67,6	0,008
	Positivo	57,4	46,7	
Invasão perineural	Negativo	81,3	68,2	<0,001
	Positivo	62,2	46,9	

**Cont/ Tabela 24**

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		5-anos	10-anos	
Estadiamento pT (AJCC7)	Tis +Ta +T1a +T1b	82,2	78,8	0,018
	T2	84,4	71,7	
	T3 + T4	64,9	41,2	
Estadiamento pN (AJCC7)	N negativo	88,0	72,6	<0,001
	N positivo	42,9	30,9	
Espessura tumoral	Até 5 mm	86,4	80,0	0,002
	> 5 mm	72,9	55,7	
HPV	Ausente	75,3	59,6	0,106
	Presente	77,5	66,3	
SOX2	Negativo	70,7	57,3	0,339
	Positivo	89,6	73,2	
ALDH1	Negativo	77,3	63,2	0,683
	Positivo	51,8	51,8	

p-valor obtido pelo teste de logrank

- **Análise multivariada**

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida câncer específica, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 25).

**Tabela 25** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

<b>Variável</b>	<b>p-valor</b>
Metástase linfonodal	<0,001
Invasão perineural	<0,001
Idade	<0,001
Estado civil	0,001
Espessura tumoral	0,002
Infiltração da uretra	0,005
Infiltração de corpos cavernosos	0,006
Invasão angiolinfática	0,008
Estádio patológico T	0,018
Grau de diferenciação	0,019
Estádio clínico T	0,027
Estádio clínico N	0,061
HPV	0,106
Margem cirúrgica	0,123
Padrão de crescimento	0,154

Conforme resultados obtidos pelo modelo de regressão de COX multivariado, as variáveis possíveis fatores prognósticos INDEPENDENTES para qualquer óbito estimados para este estudo foram:

- ✓ Faixa etária acima de 60 anos mostrou risco para óbito de 3 vezes mais chance do que os pacientes com menos de 60 anos.
- ✓ Presença de invasão perineural tem aproximadamente 2 vezes mais chance de óbito que ausência de invasão.
- ✓ Estadiamento pT T3 ou T4 tem mais chance de óbito do que os pT (Tis +Ta +T1a +T1b) com quase 2 vezes mais risco (pT2 não mostra risco).
- ✓ Presença de linfonodos positivos tem aproximadamente 3 vezes mais chance de óbito que os casos com ausência dos mesmos, conforme Tabela 26.

**Tabela 26** - Tabela A. Estimativa dos possíveis fatores prognósticos independentes estimados através do Risco Relativo (RR) e respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC) obtidos pelo modelo de regressão de COX para qualquer óbito.

Variável	Categoria	N	RR (95%IC) multivariado
Faixa etária (anos)	≤ 60	135	1,0 (ref.)
	> 60	68	3,27 (2,08 – 5,13)
Invasão perineural	Negativo	141	1,0 (ref.)
	Positivo	51	2,38 (1,41 – 4,00)
pT (AJCC7)	Tis +Ta +T1a +T1b	37	1,0 (ref.)
	T2	101	1,19 (0,65 – 2,19)
	T3 + T4	47	2,04 (1,04 – 3,98)
Linfonodos positivos	Não	150	1,0 (ref.)
	Sim	53	2,98 (1,74 – 5,09)

Portanto idade, presença de invasão perineural, estadiamento pT (AJCC7) e presença de linfonodos positivos mostraram ser fatores prognósticos independentes para óbito neste estudo.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 ASPECTOS GERAIS**

A neoplasia de pênis é uma doença mais prevalente nos países em desenvolvimento, provavelmente pelas piores condições socioeconômicas e de higiene, além da ausência de medidas preventivas. Nessas localidades ainda temos dificuldade de diagnóstico precoce e com isso, dificuldade no tratamento adequado da doença. Temos então que a maioria dos estudos com grandes incidências que possibilitam a identificação de fatores de risco para a ocorrência de metástases são originários desses países (KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996).

Geralmente os pacientes apresentam câncer de pênis entre 40 e 70 anos. Nesta série, a média de idade foi de 54,9 (dp=12,7), sendo que 73% dos pacientes apresentavam-se com menos de 60 anos, e a mediana foi de 54 anos. Estudos brasileiros mostram média entre 55 e 60 anos, enquanto os de países desenvolvidos a média se eleva, chegando próximo de 70 anos (HORENBLAS e VAN TINTERE 1994; ORNELLAS et al. 1994; HERNANDEZ et al. 2008; FAVORITO et al. 2008). A presença de doentes mais jovens no Brasil talvez se deva às diferenças de condições de vida, menor número de postectomias (em nossa amostra apenas 4,4% dos pacientes eram postectomizados antes do aparecimento do tumor), que se tem demonstrado um fator protetor, além das diferenças geográficas. Corroborando com essas más condições de assistência médica, tivemos nessa amostra mais de 50% dos

pacientes com demora superior a 6 meses após o início dos sintomas para conseguir iniciar tratamento médico (média de 17,7 meses).

Em relação à apresentação clínica da doença na primeira consulta ao serviço de assistência terciária, como é o A.C.Camargo Cancer Center, foi observado, nesta série, que 72,4% dos pacientes apresentavam o tumor primário intacto, enquanto apenas 2% dos mesmos chegaram ao consultório do especialista já amputado. A biópsia do tumor foi realizada em 25,6% dos casos. Os dados mais uma vez, corroboram a dificuldade do diagnóstico e tratamento adequados em países como o Brasil.

## **6.2 METÁSTASE LINFONODAL**

Existe um consenso de que o carcinoma de pênis deva ser diagnosticado e tratado precocemente. Sabe-se que o tratamento de escolha é o cirúrgico, variando a extensão da cirurgia de acordo com o tamanho e a invasão do tumor. É notório que a linfadenectomia, quando indicada, representa a única forma de cura do tumor, determinando um bom prognóstico para o doente, já que a presença de metástase linfonodal representa o principal fator de prognóstico do carcinoma peniano (STAUBITZ et al. 1955; WAJSMAN et al. 1977; NARAYANA et al. 1982; SUFRIN e HUBEN 1987; YOUNG et al. 1991; KAMAT et al. 1993; ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996). SUFRIN e HUBEN (1987) estudaram a sobrevida de várias séries e encontraram sobrevida global de 51,6%; considerando-se pacientes com linfonodos metastáticos e não metastáticos, a sobrevida a 5 anos foi de 27,5 e 66,2% respectivamente. Da mesma forma HORENBLAS e VAN TITEREN (1994),

mostraram índices de sobrevida de 50 e 93% em 5 anos para pacientes com e sem metástases linfonodais, enquanto SRINIVAS et al. (1987) apresentaram índices de 28 e 74% respectivamente. Na nossa série, a sobrevida câncer específica em 10 anos para pacientes com e sem metástase linfonodal foi de 55,3 e 93,2% e a sobrevida global em 10 anos foi de 30,9 e 72,6%.

Com isso, diversos estudos vêm tentando, ao longo dos anos, identificar fatores de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais no carcinoma de pênis (ORNELLAS et al. 1994; LOPES et al. 1996). HALL et al. (1998), estudando espessura tumoral e observaram que aqueles tumores com mais de 5mm de espessura, apresentavam uma incidência aumentada de metástases linfonodais, assim como LOPES et al. (1996) e CAMPOS et al. (2006), que mostraram significância em tumores com mais de 5mm como mais associados a metástases em linfonodos. A casuística obtida neste estudo, apresentou significância estatística para a espessura tumoral como preditor de metástases linfonodais ( $p= 0,036$ ). Além disso, como era de se esperar, o estadiamento N clínico apresentou significância nesse quesito, em amostra univariada ( $p=0,001$ ) e multivariada ( $RR = 4,73$ ; IC 95% [1,67 – 13,43]). Já a diferenciação entre os estadiamentos T, não demonstrou diferença na previsão de metástase linfonodal ( $p=0.219$ ).

Analisando invasão linfática e vascular pelo tumor, estudos mostram que essas variáveis são preditoras de metástases linfonodais, tanto na análise univariada, quanto na multivariada (FRALEY et al. 1989; LOPES et al. 1996; SLATON et al. 2001). LOPES et al. (1996), além de concluírem que a presença desses êmbolos tumorais são indicadores significativos de risco para metástases linfonodais tanto na análise univariada, quanto na multivariada, atribuíram um risco de disseminação da

doença para linfonodos inguinais de 63,5% para pacientes com êmbolos tumorais e de 30,6% para aqueles sem sinais patológicos de embolização tumoral. Nossa população também apresentou pior prognóstico nos pacientes com invasão angiolinfática, com significância na análise univariada ( $p=0,002$ ), como fatores prognósticos no desenvolvimento de metástase linfonodais, porém não na avaliação multivariada. Já a invasão perineural mostrou-se preditora de metástases linfonodais, em análises uni e multivariadas, ( $p<0,001$  e  $RR= 7,50$  IC 95% [3,45 – 16,33] respectivamente), assim como na literatura (CHAUX et al. 2009).

Em relação ao grau de diferenciação histológica do tumor, estudos têm demonstrado que quanto menos diferenciado é o tumor, mais metástases linfonodais ele apresenta e conseqüentemente, pior sobrevida quando comparados àqueles bem diferenciados (SRINIVAS et al. 1987; SOLSONA et al. 1992; HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; ORNELLAS et al. 1994; SLATON et al. 2001). Demonstra-se nesse estudo, uma significância estatística na análise univariada ( $p=0,001$ ) do grau de diferenciação tumoral como preditor de metástases linfonodais. SOLSONA et al. (2001) mostraram que o risco de metástases linfonodais para tumores de baixo grau ou bem diferenciados foi superior em 15 vezes, enquanto para os tumores de alto grau ou indiferenciados foi superior em 75 vezes.

A correlação entre o local de invasão tumoral e a metástase linfonodal vem sendo mostrado na literatura ao longo dos anos (HORENBLAS e VAN TINTEREN 1994; PIZZOCARO et al. 1997; VILLAVICENCIO et al. 1997; SLATON et al. 2001). Nessa série, apenas a invasão dos corpos cavernosos ( $p=0,014$ ); corpo esponjoso e invasão uretral, não demonstraram ser preditores de risco para metástase linfonodal com  $p=0,591$  e  $p=0,161$ , respectivamente na análise univariada. Em um

outro trabalho, FICARRA et al. (2005), mostraram significância estatística da invasão uretral ( $p < 0,01$ ) e também da invasão do corpo esponjoso ( $p < 0,01$ ) como fortes preditores no envolvimento linfonodal no carcinoma peniano.

Em relação aos aspectos cirúrgicos no manejo do paciente portador de carcinoma peniano, nossa casuística apresentou 54,7% de amputação parcial e 41,4% de amputação total, com apenas 3,0% de ressecção local (postectomia ou biopsia excisional), no que se refere ao tratamento do tumor primário. Provavelmente isso ocorreu pela presença de doença mais avançada (estádios clínicos T3 e T4) (63,8%). Esses dados coincidem com a maioria dos trabalhos na literatura (FRALEY et al. 1989; LOPES et al. 1996; FICARRA et al. 2006), nos quais as amputações são opções iniciais, e muitas vezes únicas de tratamento do tumor primário. Por outro lado, vale ressaltar, a importância de técnicas conservadoras, atualmente, cada vez mais realizadas (OZSAHIN et al. 2006; KAYES et al. 2007; MEIJER et al. 2007; TEWARI et al. 2007), e cujas vantagens são a preservação funcional e estética do membro, sem menosprezar o princípio fundamental da cirurgia oncológica que é o da segurança e o da curabilidade da doença. É importante lembrar, contudo, que nos pacientes tratados com técnicas conservadoras, o seguimento do mesmo, deve ser cuidadoso e bem protocolado, evitando os altos índices de recidiva seja ela local e/ou regional (LONT et al. 2006). Nessa série a recorrência locorregional ocorreu em 11 casos (16,4%) e à distância em um caso (1,5%). Em outros dois casos (3,0%), houve recorrência tanto locorregional como à distância.

A técnica clássica da linfadectomia não é isenta de complicações (ORNELLAS et al. 1991), podendo chegar a 70% (LOPES 1995). Na literatura o índice médio de complicações relatadas está em torno de 60% (SKINNER et al.

1972; KAMAT et al. 1993). As séries contemporâneas apresentam índices menores de complicações, em torno de 50%, a partir de adequados cuidados técnicos durante a cirurgia e no pós-operatório (BEVAN-THOMAS et al. 2002; NELSON et al. 2004). Nessa série, dos 98 pacientes (48,3%) submetidos à linfadenectomia, 82 pacientes (83,7%) apresentaram complicações isoladas ou associadas. Destas, as mais frequentes foram as complicações de menor intensidade, como a infecção, deiscência e necrose de retalhos dermogordurosos, isolados ou em conjunto (46,8%), seguido de linfedema isolado ou não (28,4%). Esse grande número de complicações, provavelmente se deve a contabilidade de casos mais antigos, classificação como complicação a infecção e a deiscência de sutura, além de seguimento rigoroso desses pacientes. Importante ressaltar que nenhum caso de linfadenectomia desse estudo foi realizado por técnica videoendoscópica. Faz-se necessário também salientar que nas primeiras décadas dessa série de casos, a opção por realizar ou não a linfadenectomia não era protocolar, sendo que a decisão dependia da opção do cirurgião responsável pelo paciente. Além desse fato, muitos pacientes, por questões de dificuldade de acesso ao hospital (visto que vários iam a São Paulo vindos do norte e nordeste brasileiro somente para realizar a cirurgia), somente retornavam ao seguimento após convocação. Dessa forma, se havia passado um longo período de tempo e clinicamente mantinha-se sem metástase linfonodal, era optado por não realizar a linfadenectomia inguinal. Esses dois fatores explicam o porque de parte dos casos que seriam normalmente submetidos a linfadenectomia (pelo estadiamento no início do tratamento) não terem sido operados.

Atualmente há uma subdivisão entre os casos de câncer de pênis, com diversos tipos histológicos, já previamente descritos e divididos em grupos de risco,

que foram adotados nessa série (GUIMARÃES et al. 2009). Analisando esse dado em nossa população, apesar de haver diferença estatística quando avaliado na previsão de metástase linfonodal ( $p=0,006$ ), isso não ocorreu na sobrevida câncer específica ( $p=0,619$ ) e na sobrevida global ( $p=0,283$ ) talvez pelo grande número de CEC de alto risco (72,4%).

Na nossa análise foram avaliados além de fatores clínico, demográficos e anatomopatológicos clássicos, o tipo de invasão segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989) que utilizaram com resultados animadores em câncer da cavidade oral, chegando a uma nova gradação de malignidade como indicador prognóstico. Em trabalho prévio do nosso grupo (GUIMARÃES et al. 2006) foi definido dois padrões de infiltração, um padrão de infiltração por deslocamento, onde as células neoplásicas parecem empurrar as células do estroma, e um padrão de invasão do tipo infiltrante, onde as células tumorais invadem permeando o estroma em cordões tumorais. Esta variável anatomopatológica apresentou significância estatística em nossa amostra, na análise univariada ( $p=0,032$ ).

Uma vez que o tratamento da metástase linfonodal é atualmente a principal forma de melhorar a sobrevida dos pacientes com tumor de pênis e a linfadenectomia inguinal apresenta grande porcentagem de complicações e sequelas, busca-se formas de selecionar qual paciente deva ser submetido a essa cirurgia para se evitar operar os casos desnecessariamente. Como os fatores clínicos ou anatomopatológicos isoladamente não têm sido capazes de predizer o risco de metástase linfonodal, nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pênis, nem na época do diagnóstico bem como no seu seguimento, novos estudos associando-se fatores

clássicos a elementos da biologia molecular são uma opção na tentativa de selecionar pacientes com maior risco de metástases linfonodais os quais devem ser tratados de princípio e definir aqueles de baixo risco para metástase, diminuindo a morbidade da terapêutica.

Há nesse momento a busca da relação entre câncer e células tronco tumorais, pois acredita-se que uma vez encontrado o ponto de replicação do tumor, há possibilidade de trabalhar as medicações quimioterápicas com alvos específicos. Dois dos principais agentes estudados no momento nessa classe são ALDH1 e SOX2. Em não havendo artigos científicos sobre a expressão desses biomarcadores nos pacientes com câncer de pênis, selecionamos esses marcadores para avaliarmos a possível relação entre o aumento desses marcadores com metástase linfonodal e com progressão de doença.

### **6.3 IMUNOISTOQUÍMICA**

As reações de imunoistoquímica foram realizadas pelo método TMA visto que o A.C.Camargo Cancer Center realiza diversos estudos com tumor de pênis e o uso dessa técnica possibilita vários estudos compartilhar o mesmo bloco de parafina. Entretanto, entendemos que isso não interfere nos resultados das marcações pois as lâminas são realizadas de forma extremamente cuidadosa por profissionais muito bem treinados no laboratório de anatomia patológica, retirando material do fronte de invasão tumoral. Essa prática é validada por estudo que demonstra que essa região corresponde a parte ativa do tumor e que teoricamente seria a área de maior reação ao marcador de imunoistoquímica. (GUIMARÃES et al. 2006)

## 6.4 IMUNOISTOQUÍMICA DE ALDH1

A aldeído desidrogenase tipo I é um conhecido marcador molecular de diferenciação extensamente investigado em vários tumores, mas não havia sido avaliado em câncer de pênis. Além disso, não há até o momento nenhum estudo demonstrando positividade do marcador em tecido peniano.

O órgão mais estudado até o momento é a mama. Sugere-se a presença da hiperexpressão de ALDH1 em carcinomas de mama triplo negativos (classificação utilizada atualmente com grande diferencial prognóstico e terapêutico) como fator independente de mau prognóstico (OHI et al. 2010; YOSHIOKA et al. 2010; KHOURY et al. 2011; ZHOU et al. 2013). Entretanto há aparentemente diferença nas pacientes mais jovens, já que um estudo não relacionou o marcador com prognóstico quando analisado em pacientes abaixo de 35 anos (TAN et al. 2013). Algumas informações interessantes foram a presença de grande expressão estromal em casos benignos e com melhor prognóstico nos casos de neoplasia com hiperexpressão estromal (DE BROT et al. 2012; SCHWARTZ et al. 2013).

O ALDH1 também está sendo bastante utilizado em tumores de cabeça e pescoço. Inicialmente foi demonstrada a presença de expressão em imunohistoquímica e citometria de fluxo em carcinomas cervicais (YAO et al. 2011). Na sequência, demonstraram que a hiperexpressão desse marcador estava relacionada com a transformação maligna em leucoplasia e eritroplasia oral (LIU et al. 2013; FENG et al. 2013). Em relação a prognóstico, a expressão de ALDH1 no carcinoma nasofaríngeo teria pior prognóstico enquanto que não alteraria no carcinoma adenocístico salivar (WU et al. 2013; ZHOU et al. 2012).

Os tumores colo-retais apresentam pior prognóstico quando a expressão desse marcador está presente, como ficou demonstrado em estudos de AVORANTA et al. (2012), KAHLERT et al. (2012) e VOGLER et al. (2012). Seguindo essa mesma linha, o ALDH1 é fator independente de mau prognóstico em glioblastomas e astrocitomas (ADAM et al. 2012; LIU P et al. 2012; LIU DY et al. 2012), câncer de bexiga (SU et al. 2010), carcinoma de células claras renais (WANG et al. 2013), câncer de próstata (LI et al. 2009) adenocarcinoma de vesícula biliar (LIU et al. 2011), adenocarcinoma endometrióide de útero (RAHADIANI et al. 2011) e CEC de esôfago (WANG et al. 2012), sendo que nesses três últimos também ficou demonstrado também maior metástase linfonodal.

Entretanto, alguns órgãos sugerem inversão na relação expressão e prognóstico, visto que a baixa expressão está presente em maior grau tumoral, aumento de proliferação e pior prognóstico. Incluem-se nesses casos a neoplasia pulmonar (CEC e adenocarcinoma) (DIMOU et al. 2012; OKUDELA et al. 2013) e câncer de pâncreas (KAHLERT et al. 2011). Quando é analisado o carcinoma de ovário, um estudo mostra melhor prognóstico e sobrevida (CHANG et al. 2009). Entretanto, estudos mais recentes relacionam pior sobrevida, maior carcinogênese em vários subtipos histológicos (KURODA et al. 2013; LIEBSCHER et al. 2013).

Pelo fato de ser marcador prognóstico de alguns CECs de outros órgãos e apresentar relação com metástase linfonodal de diversos órgãos, importante fator prognóstico em tumores de pênis, acreditamos que esse marcador seria muito útil em carcinoma peniano.

Em nossa amostra, apesar de várias tentativas com diversas diluições diferentes, baseados em metodologias empregadas em outros órgãos, apenas 5 casos

(2,5%) apresentaram alguma reatividade ao ALDH1. Interessante ressaltar que os casos positivos aconteceram também em casos antigos, armazenados há mais de 50 anos (os casos positivos são dos anos de 1956, 1961, 1963, 1979 e 1981), o que diminui a possibilidade de perda da reatividade por se tratar de blocos de parafina antigos. Na literatura, um único estudo sobre carcinoma de vulva, também demonstrou baixa positividade do marcador (6,5% dos casos) (WU et al. 2014). Como não há na literatura nenhum estudo desse marcador em tecido peniano, podemos aventar a hipótese que este não é um bom marcador câncer de pênis. Entretanto, como foram feitas apenas avaliações em tecido de bloco de parafina e apenas pela técnica de imunistoquímica, não podemos chegar a essa conclusão definitiva sem novos experimentos.

Sugerimos o uso de outras técnicas que não a imunistoquímica para buscar analisar a associação entre ALDH1 e carcinoma peniano.

Por conta dessa baixa positividade, optou-se por realizar uma avaliação apenas descritiva desses 5 casos. Foi considerado positivo o caso qualquer valor de reatividade, assim como realizado por outros autores (KITAMURA et al. 2013; RABINOVICH et al. 2018).

Avaliando todos os casos, algumas variáveis foram predominantes entre os casos positivos, como o estágio clínico (todos foram IIIb), estágio cN+ (100%), pior grau histológico (80% alto grau) e tipo histológico CEC de alto risco (80%), corroborando com a maioria dos estudos atuais em CECs (WU et al. 2013; YANG et al. 2017). Apesar de todos esses fatores levarem a pior prognóstico, como o número de casos positivos são extremamente baixos, como esperado não houve diferença significativa na sobrevida câncer específica nesses 5 casos positivos ( $p=0,547$ ).

## 6.5 IMUNOISTOQUÍMICA DE SOX2

A SOX2, também tem sido estudada em sua relação com diversas neoplasias, como mama, esôfago, ovário, próstata, entre outros. Da mesma forma que a ALDH1, a SOX2 também não foi estudada em câncer de pênis, o que dificulta a identificação de um valor de corte para a sua positividade, bem como a comparação dos resultados. Na literatura não há consenso sobre quais os valores de expressão de SOX2 nas células tumorais são considerados como valor normal (normal like), valor aumentado (up regulation) e valor diminuído (down regulation) em diferentes tecidos estudados, sendo utilizados a avaliação através de intensidade e área positiva da reação. Optamos por não utilizar a intensidade de quantificação, pois como a nossa amostra é extensa e com delta temporal muito elevado (mais de 50 anos entre o primeiro e o último caso colocado na casuística), consideramos que os blocos de parafina mais antigos poderiam demonstrar marcações menos intensas e poderiam causar grande viés. Em relação a porcentagem de área positiva, fizemos divisão em 5 parâmetros (0 1-25% 26-50%, 51-75%, acima de 76%). A maior parte dos casos não apresentou imunorreatividade (66%) e a maior parte dos positivos estavam na faixa entre até 25% (24,1%), como já demonstrado em Metodologia. A partir desse momento, optamos por realizar testes estatísticos considerando vários agrupamentos contra o negativo, e percebeu-se que os casos positivos se equiparavam, independentemente da porcentagem de positividade. Dessa forma, decidimos considerar positivo qualquer intensidade de expressão do marcador, assim como outros autores (HERREROS-VILLANUEVA 2014, CAMILO et al. 2014, RODRIGUEZ-PINILLA 2014).

A imunexpressão de SOX2 parece interferir na possibilidade de metástases linfonodais e no prognóstico do paciente em diversos tumores. Como não há nenhum registro da análise da expressão desse anticorpo em câncer de pênis, utilizaremos os dados da literatura de outros tumores, como colo de útero, pele, bexiga, cólon, próstata, pâncreas, ovário, além de demonstrar a sua relação com a proliferação celular e possíveis alvos de terapia (MAIER et al. 2011; ZHANG et al. 2012; LOU et al. 2013; AMINI et al. 2014; LIU et al. 2014; HERREROS-VILLANUEVA 2014, SANTINI et al. 2014).

Alguns dos estudos mais avançados são em relação a câncer de mama e demonstram um pior prognóstico, além de metástase linfonodal, relação com triplo negativo e maior grau histológico quando esses tumores expressam SOX2 (ABD EL-MAQSUD e ABD EL-REHIM 2014; HUANG et al. 2014). Da mesma forma, existe a mesma relação de pior prognóstico com o aumento do marcador nos tumores de esôfago (NAGARAJA e ESLICK 2013; FORGHANIFARD et al. 2014), pulmão de pequenas células (YANG et al. 2013), colangiocarcinoma (GU e JANG 2014), laringe (TANG et al. 2013) e hepatocelular (SUN et al. 2013).

Em nossa amostra de 203 casos, tivemos a expressão da SOX2 positiva em 69 (34%) e negativa em 134 casos (66%). Analisando essa marcação com as variáveis clínico demográficas avaliadas (idade, raça, tempo de evolução, antecedentes venéreos, postectomia, estágio clínico T e estágio clínico N) não encontramos diferença entre os dois grupos. Entretanto, quando analisamos a marcação em relação a dados anatomopatológicos, há relação estatisticamente significativa em relação a padrão de crescimento, infiltração de corpo esponjoso e uretra. O padrão de crescimento relacionado a maior expressão de SOX2 foi a de padrão superficial,

geralmente relacionado a menor agressividade do tumor. Da mesma forma, a ausência de infiltração de uretra e corpo esponjoso foi relacionado a maior expressão do marcador, assim como os estádios pT menos agressivos. Apenas analisando esses fatores, a tendência do marcador em câncer de pênis é de aumento da marcação em casos menos agressivos, com melhor prognóstico nos casos de expressão de SOX2, como aconteceu também em alguns estudos de câncer de pulmão de não pequenas células e colo do útero (VELCHETI et al. 2013; KIM et al. 2015).

A metástase linfonodal já é reconhecida como a principal via de disseminação de câncer de pênis, iniciando geralmente na região inguinal e posteriormente para a região pélvica (ZHU 2012). Entretanto como mais de 20% dos linfonodos positivos não são clinicamente palpáveis e pelo menos esse mesmo montante de indivíduos tem linfonodos palpáveis que na verdade são inflamatórios e não metastáticos, buscam-se formas de definir qual paciente deve ser submetido a cirurgia de linfadenectomia, que é uma cirurgia com alto índice de complicações, como já foi visto anteriormente nesse estudo. Nesse momento, grau histológico, estadiamento clínico, subtipo histológico e invasão angiolinfática são os principais fatores preditores de envolvimento linfonodal (HEGARTY et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2009). Vários autores sugeriram usar biomarcadores como p53, Ki-67, e-caderina, metaloproteinase-9 entre outros para prever a metástase linfonodal e o prognóstico dos pacientes, porém até o momento nenhum desses marcadores estão sendo usados na prática clínica (ZHU et al. 2007 2008; GUIMARÃES et al. 2007). Entretanto, assim como relatado por outros autores, não houve correlação da expressão de SOX2 com presença de metástase linfonodal, que é o principal fator independente prognóstico nesse tipo de tumor (HUANG et al. 2014; CHUANG et al. 2015). Da

mesma forma, outros fatores importantes de avaliação prognóstica, como invasão angiolinfática, invasão perineural e grau histológico não demonstraram nenhuma relação estatística com a expressão de SOX2.

Avaliando-se sobrevida, tanto doença específica como global, não houve nenhuma mudança com a variação da reatividade de SOX2 em nossa amostra, assim como demonstrados por outros autores em neoplasias tipo CEC de hipofaringe, laringe e sinonasal (GONZÁLEZ-MÁRQUEZ et al. 2013) e CEC de vulva, órgão de mesma região com fatores de risco semelhantes ao câncer de pênis (BRUSTMANN e BRUNNER 2013).

Alguns estudos demonstram que o marcador SOX2 tende a aumentar nas fases de transição entre epitélio normal, doenças pré-malignas, tumores in situ e neoplasias definitivas nos tecidos de mucosa oral e vulva (QIAO et al. 2013; BRUSTMANN e BRUNNER 2013), o que pode ser um alvo de um próximo estudo com SOX2 e pênis, uma vez que nosso estudo demonstrou que há reatividade desse marcador com tecido peniano. Sugerimos também a realização de estudos com outras formas de análise que não a imunoistoquímica isolada.

## **6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ao final desse estudo, podemos destacar como os principais pontos positivos a possibilidade de utilizar um banco de tumor com mais de 200 casos, com verificação dos fatores anatomopatológicos realizados por alguns dos mais especializados patologistas em câncer de pênis. Os dados clínicos diagnósticos e os de seguimento são extremamente confiáveis pois são coletados por um grupo seletivo

de urologistas de apenas uma instituição, seguindo protocolo bem estabelecido, com a colaboração de enfermeiros e assistentes sociais especializados em oncologia. Outros fatores muito importantes são a experiência, competência e o comprometimento de todo o setor de anatomia patológica na realização das laminas de TMA e a sua posterior marcação imunoistoquímica.

Por outro lado, há algumas limitações a este estudo como ser retrospectivo, haver um espaço de tempo muito longo entre o primeiro e o último caso analisado, não dispor de material fresco para a realização das reações de imunoistoquímica e não haver estudos prévios com os mesmos marcadores em câncer de pênis.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo podemos concluir que:

- 1 A expressão por imunistoquímica de SOX2 é presente no carcinoma peniano. A expressão por imunistoquímica de ALDH1 não é considerável no carcinoma peniano.
- 2 Dentre as variáveis clínico demográficas, houve associação entre os índices de imunorreatividade da SOX2 apenas Estado civil. Dentre as variáveis anatomopatológicas avaliadas apenas o Padrão de crescimento e as Infiltrações de corpo esponjoso e uretra correlacionaram com a expressão de SOX2.
- 3 Não há associação de SOX2 com a presença de metástase linfonodal, a sobrevida câncer específica e a sobrevida global.
- 4 A imunorreatividade por imunistoquímica de ALDH1 é extremamente limitada não havendo possibilidade de análise estatística com as variáveis.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Maqsoud NM, Abd El-Rehim DM. Clinicopathologic implications of EpCAM and Sox2 expression in breast cancer. **Clin Breast Cancer** 2014; 14:e1-9.

Abi-Aad AS, DeKernion JB. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19:319-24.

Adam SA, Schnell O, Pöschl J, et al. ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. **Brain Pathol** 2012; 22:788-97.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:3983-8.

Altman DG. **Practical Statistics for Medical Research**. London: Chapman & Hall; 1991a. Análise de sobrevivência; Kaplan-Meier; p.365-86.

Altman DG. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall; 1991b. Modelo de regressão de Cox; p.387-93.

Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tc11, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. **Anat Cell Biol** 2014; 47:1-11.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res** 1987; 95:229-49.

Antonelli CBG, Novaes PE, Alves AC, Lopes A. Rhabdomyosarcoma of the penis in a 15-month-old-boy. **J Urol** 1998; 160:2200-1.

Ashley DJB, Edwards EC. Sarcomas of the penis: report of a case with a review of the literature. **Br J Urol** 1957; 45:170-9.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev** 2002; 17:126-40.

Avoranta ST, Korkeila EA, Syrjänen KJ, Pyrhönen SO, Sundström JT. Lack of CD44 variant 6 expression in rectal cancer invasive front associates with early recurrence. **World J Gastroenterol** 2012; 18:4549-56.

Barnes KT, McDowell BD, Button A, Smith BJ, Lynch CF, Gupta A. Obesity is associated with increased risk of invasive penile cancer. **BMC Urol** 2016; 16:42

Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-Sang J, Guiliano AR. Incidence trends in primary malignant penile cancer. **Urol Oncol** 2007; 25:361-7.

Barrasso R, Brux JD, Croissant O, Orth G. High prevalence of papillomavirus associated penile intraepithelial neoplasm in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. **N Engl J Med** 1987; 317:916-23.

Beggs JH, Spratt JS Jr. Epidermoid carcinoma of the penis. **J Urol** 1964, 91:166-72.

Bevan-Thomas R, Slaton JW, Pettaway CA. Contemporary morbidity from lymphadenectomy for penile squamous cell carcinoma: the M.D. Anderson Cancer Center Experience. **J Urol** 2002; 167:1638-42.

Bezerra AL, Lopes A, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus DNA prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. **Am J Surg Pathol** 2001a; 25:673-8.

Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Cancer** 2001b; 91:2315-21.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 1997; 3:730-7.

Brinton LA, Juan-Yao L, Shou-De R, et al. Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China. **Int J Cancer** 1991; 47:504-9.

Broker RT. Structure and genetic expression of papillomaviruses. **Obstet Gynecol Clin North Am** 1987; 14:329-45.

Brumini R, Torloni H, Gotlieb SLD, Henson DE, Souza JMP. **Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976/80**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982. (Campanha Nacional de Controle do Câncer).

Brustmann H, Brunner A. Immunohistochemical expression of SOX2 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 2013; 32:323-8.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:432-7.

Buddington WT, Kickham CJ, Smith WE. An assessment of malignant disease of the penis. **J Urol** 1963; 89:442-9.

Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer: clinical presentation, diagnosis and staging. **Urol Clin North Am** 1992; 16:247-56.

Cabanas RM. An approach for the treatment of the penile carcinoma. **Cancer** 1977; 39:456-66.

Camilo V, Barros R, Celestino R, et al. Immunohistochemical molecular phenotypes of gastric cancer based on SOX2 and CDX2 predict patient outcome. **BMC Cancer** 2014; 14:753.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the pênis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. **J Urol** 1988; 140:836.

Catalona WJ. Role of lymphadenectomy in carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1980; 7:785-92.

Chang B, Liu G, Xue F, et al. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. **Mod Pathol** 2009; 22:817-23.

Chaux A, Caballero C, Soares FA, et al.. The prognostic index: a useful pathologic guide for prediction of nodal metastases and survival in penile squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1049-57.

Chaux A, Soares F, Rodríguez I, et al. Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features, differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **Am J Surg Pathol** 2010a; 34:223-30.

Chaux A, Tamboli P, Ayala A, et al. Warty basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm: report of 45 cases. **Mod Pathol** 2010b; 23:896-904.

Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. **Leukemia** 2007; 21:1423-30.

Chew JL, Loh YH, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. **Mol Cell Biol** 2005; 25:6031-46.

Chuang WY, Chang YS, Chao YK, et al. High sex determining region Y-box 2 (SOX2) expression correlates with absence of nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:9248-55.

Coblentz TR, Theodorescu D. Morbidity of modified prophylactic inguinal lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2002; 168:1386-9.

Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. **World J Urol** 2008; 27:169-77.

Cubilla AL, Velazquez EF, Amin MB, Epstein J, Berney DM, Corbishley CM. The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. **Histopathology** 2018; 72, 893-904.

Cunha IW, Guimaraes GC, Soares F, et al. Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:551-5.

Cunha RP, Viana G, Lima AO, Bravo A, Branco J, Couto A. Carcinoma epidermóide do pênis com metástase inguinal bilateral em crianças de 12 anos de idade. **J Br Urol** 1981; 7:147-8.

Cupp MR, Malek RS, Goelner JR, Smith TF, Espy MJ. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. **J Urol** 1995; 154:1024-9.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. **Annu Rev Med** 2007; 58:267-84.

Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking for in situ and invasive disease. **Int J Cancer** 2005; 116:606-16.

Das S. Penile amputations for the management of primary carcinoma of the penis. **Urol Clin North Am** 1992; 19:277-82.

De Brot M, Rocha RM, Soares FA, Gobbi H. Prognostic impact of the cancer stem cell related markers ALDH1 and EZH2 in triple negative and basal-like breast cancers. **Pathology** 2012; 44:303-12.

Dehner LP, Smith BH. Soft tissue tumors of the penis. **Cancer** 1970; 25:1431-6.

Dekernion JB, Tynberg P, Persky L, Fegen JP. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1973; 32:1256-62.

Dennis EJ, Heins HC, Latham E, Mciver FA, Pratt-Thomas HR. The carcinogenic effect of human smegma: an experimental study. I. Preliminary report. **Cancer** 1956; 9:671-80.

Derrick FC Jr, Lynch KM, Kretkowski RC, Yarbrough W. Epidermoid carcinoma of the penis: computer analysis of 87 cases. **J Urol** 1973; 110:303-5.

Dimou A, Neumeister V, Agarwal S, Anagnostou V, Syrigos K, Rimm DL. Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. **Am J Pathol** 2012; 181:1436-42.

Dräger DL, Heuschkel M, Protzel C, et al. [18F]FDG PET/CT for assessing inguinal lymph nodes in patients with penile cancer - correlation with histopathology after inguinal lymphadenectomy. **Nuklearmedizin** 2018; 57:26-30.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. IARC Press: Lyon; 2004. Penile cancer; p.279-98. (WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 7).

Ekstrom T, Edsmyr F. Cancer of the penis: a clinical study of 229 cases. **Acta Chir Scand** 1958; 115:25-45.

Elsamra SE, Poch MA. Robotic inguinal lymphadenectomy for penile cancer: the why, how, and what. **Transl Androl Urol** 2017; 6:826-32.

Favorito LA, Nardi AC, Ronalsa M, Zequi SC, Sampaio FJ, Glina S. Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol** 2008; 34:587-91; discussion 591-3.

Fegen JP, Beebe D, Persky YL. Basal cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1970; 104:864-6.

Feng JQ, Xu ZY, Shi LJ, Wu L, Liu W, Zhou ZT. Expression of cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 in oral erythroplakia and the risk of oral cancer. **J Oral Pathol Med** 2013; 42:148-53.

Ficarra V, Zattoni F, Cunico SC, et al. Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Grupo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data. **Cancer** 2005; 103:2507-16.

Ficarra V, Zattoni F, Artibani W, et al. Nomogram predictive of pathological inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:1700-5.

Fishman M, Friedman HF, Stewart HL. Local effect of repeated application of 3,4-benzpyrene and of smegma to the vagina and cervix of mice. **J Natl Cancer Inst** 1942; 2:361-73.

Forghanifard MM, Ardalan Kholes S, Javdani-Mallak A, et al. Stemness state regulators SALL4 and SOX2 are involved in progression and invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma. **Med Oncol** 2014; 31:922.

Fraley EE, Zhang G, Sazama R, Lange PH. Cancer of the penis: prognosis and treatment plans. **Cancer** 1985; 55:1618-24.

Fraley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. **J Urol** 1989; 142:1478-82.

Frisch M, Friis S, Kjaer SK, Melbye KM. Falling incidence of penis cancer in an uncircumcised population (Denmark 1943-90). **BMJ** 1995; 311:1471.

Gao W, Song LB, Yang J, et al. Risk factors and negative consequences of patient's delay for penile carcinoma. **World J Surg Oncol** 2016; 14:124.

Gentil FC, Lopes A, Epifânio ITN, Cavalcante SF, Souza, Sá AO. Esvaziamento inguino-iliaco: técnica e tática operatória. **Acta Oncol Bras** 1986; 6:83-6.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell** 2007; 1: 555-67.

Golijanin D, Tan JY, Kazior A. Cyclooxygenase-2 and Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 are overexpressed in squamous cell carcinoma of the penis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1024-31.

Graafland NM, Leijte JAP, Valde's Olmos RA, Hoefnagel CA, Teerstra HJ, Horenblas S. Scanning with 18F-FDG-PET/TC for detection of pelvic nodal involvement in inguinal node positive penile carcinoma. **Eur Urol** 2009; 56:339-45.

González-Márquez R, Llorente JL, Rodrigo JP, et al. SOX2 expression in hypopharyngeal, laryngeal, and sinonasal squamous cell carcinoma. **Hum Pathol** 2014; 45:851-7.

Gu MJ, Jang BI. Clinicopathologic significance of Sox2, CD44 and CD44v6 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Pathol Oncol Res** 2014; 20:655-60.

Guimarães GC. **Estudos de fatores prognósticos e da expressão imunoistoquímica de PCNA e MIB-1 / KI-67 em pacientes portadores de CEC de pênis**. São Paulo; 2003. [Dissertação-Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, et al. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? **Urology** 2007; 70:137-42.

Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, et al. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. **J Urol** 2009; 182:528-34; discussion 534.

Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, et al. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **Eur Urol** 2015; 67:142-50.

Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. Deoxyribonucleic acid flow cytometry and traditional pathologic variables in invasive penile carcinoma assessment of prognostic significance. **Urology** 1998; 52:11-6.

Harish K, Ravi R. The role of tobacco in penile carcinoma. **Br J Urol** 1995; 75:375-7.

Harmer MH. **TNM: Classification of malignant tumors**. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva: UICC; 1978. Penis; p.126-8.

Hegarty PK, Kayes O, Freeman A, et al. A prospective study of 100cases of penile cancer managed according to European Association ofUrology guidelines. **BJU Int** 2006; 98:526.

Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behavior? **Br Med J** 1987; 1295:1306-8.

Hermanek P, Sobin LH. **TNM: Classification of malignant tumors**. 4<sup>th</sup> ed. rev. Berlin: Springer Verlag; 1987. Penis; p.130-2.

Hernandez BY, Barnholtz-Sloan J, German RR, et al. Burden of invasive squamous cell carcinoma of the penis in the United States 1998-2003. **Cancer** 2008; 113:2883-91.

Herr HW. Surgery of penile and urethral carcinoma. In: Walsh PC; Retik AB; Stamey TA; Vaughan ED, editors. **Campbell's urology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W. B. Saunders; 1992. p.3073-89.

Herreros-Villanueva M, Zhang JS, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. **Oncogenesis** 2013; 2:e61.

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JFM, Moonen LMF, Lustig G V, Kroger R. Squamous cell carcinoma of the penis: accuracy of the tumors, nodes and metastasis classification system, and role of lymphangiography, computerized tomography scan and fine needle aspiration cytology. **J Urol** 1991; 146:1279-83.

Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JFM, Moonen LMF, Lustin V, van Waardenburg EW. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. **J Urol** 1993; 149:492-7.

Horenblas S, Van Tinteren H. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. **J Urol** 1994; 151:1239-43.

Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, et al. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. **J Urol** 2000; 163:1000-4.

Hosmer DW, Stanley L. **Applied logistic regression**. New York: John Wiley & Sons; 1989.

Huang YH, Luo MH, Ni YB, et al. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. **Histopathology** 2014; 64:494-503.

Iwasawa A, Kumamoto Y, Fujinaga K. Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in penile carcinoma by polymerase chain reaction and in situ hybridization. **J Urol** 1993; 149:59-63.

Jackson SM. The treatment of carcinoma of the penis. **Br J Surg** 1966; 53:33-5.

Johnson DE, Fuerst DE, Ayala AG. Carcinoma of the penis: experience in 153 cases. **Urology** 1973; 1:404-8.

Kahlert C, Bergmann F, Beck J, et al. Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. **BMC Cancer** 2011; 11:275.

Kahlert C, Gaitzsch E, Steinert G, et al. Expression analysis of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) in colon and rectal cancer in association with prognosis and response to chemotherapy. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:4193.

Kamat MR, Kulkarni JN, Tongaonkar HB. Carcinoma of the penis: the Indian experience. **J Surg Oncol** 1993; 52:50-5.

Kattan MW, Ficarra V, Artibani W, et al. Nomogram predictive of cancer specific survival in patients undergoing partial or total amputation for squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 2006; 175:2103-8.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Statist Assoc** 1958; 53:457-81.

Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct transformation of elevated aldehyde deshydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. **Blood** 1990; 75:1947-50.

Kayes O, Minhas S, Allen C, Hare C, Freeman A, Ralph D. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. **Eur Urol** 2007; 51:1313-9.

Kim BW, Cho H, Choi CH, et al. Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. **BMC Cancer** 2015; 15:1015.

Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandrasekhar R, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. **Mod Pathol** 2011; 25:388-97.

Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, et al. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. **Mod Pathol** 2013; 26:117-24.

Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. **PLoS One** 2013; 8:e65158.

Leijte JAP, Kroon BK, Valde's Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. **Eur Urol** 2007; 52:170-7.

Leijte JAP, Gallee M, Antonini N, Horenblas S. Evaluation of current TNM classification of penile carcinoma. **J Urol** 2008; 180:933-8; discussion 9.

Leijte JA, Hughes B, Graafland NM, et al. Two-center evaluation of dynamic sentinel node biopsy for squamous cell carcinoma of the penis. **J Clin Oncol** 2009; 27:3325-9.

Li T, Su Y, Mei Y, et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. **Lab Invest** 2009; 90:234-44.

Licklider S. Jewish penile carcinoma. **J Urol** 1961; 86:98.

Liebscher CA, Prinzler J, Sinn BV, et al. Aldehyde dehydrogenase 1/epidermal growth factor receptor coexpression is characteristic of a highly aggressive, poor-prognosis subgroup of high-grade serous ovarian carcinoma. **Hum Pathol** 2013; 44:1465-71.

Liu DC, Yang ZL, Jiang S. Identification of musashi-1 and ALDH1 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma. **Cancer Biomark** 2011; 8:113-21.

Liu DY, Ren CP, Yuan XR, et al. ALDH1 expression is correlated with pathologic grade and poor clinical outcome in patients with astrocytoma. **J Clin Neurosci** 2012; 19:1700-5.

Liu P, Brown S, Goktug T, et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. **Br J Cancer** 2012; 107:1488-97.

Liu W, Wu L, Shen XM, Shi LJ, Zhang CP, Xu LQ, Zhou ZT. Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. **Int J Cancer** 2013; 132:868-74.

Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. **PLoS One** 2014; 9:e87092.

Lohberger B, Rinner B, Stundl N, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. **PLoS One** 2012; 7:e43664.

Lont AP, Gallee MPW, Meinhardt W, van Tinteren H, Horenblas S. Penis conserving treatment for t1 and t2 penile carcinoma: clinical implications of a local recurrence. **J Urol** 2006; 176:575-80.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Oncologia cirurgica. **Acta Oncol Bras** 1993; 13:2-3.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Câncer de pênis. **Ambito Hospitalar** 1994; 58:5-13.

Lopes A. **Fatores clínicos e anatomopatológicas envolvidos no risco de metastases linfonodais e no prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma de pênis tratados por cirurgia.** São Paulo; 1995. [Tese-Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Lopes A, Hildago GS, Kowalski LP, Torloni H, Rossi BM, Fonseca FP. Prognostic factors in carcinoma of penis: multivariate analysis of 145 patients treated with amputation and lymphadenectomy. **J Urol** 1996; 156:1637-42.

Lopes A, Bezerra AL, Serrano SV, Hidalgo GS. Iliac nodal metastases from carcinoma of the penis treated surgically. **BJU Int** 2000; 86:690-3.

Lopes A, Bezerra AL, Pinto CAL, Serrano SV, Abdon de Mello C, Villa LL. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. **J Urol** 2002; 168:81-6.

Lou X, Han X, Jin C, et al. SOX2 targets fibronectin 1 to promote cell migration and invasion in ovarian cancer: new molecular leads for therapeutic intervention. **OMICS** 2013; 17:510-8.

Lucchesi FR, Reis RB, Faria EF, et al. Incremental value of MRI for preoperative penile cancer staging. **J Magn Reson Imaging** 2017; 45:118-124.

Luo Y, Dallaglio K, Chen Y, et al. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. **Stem Cells** 2012; 30:2100-13.

Maden C, Sherman KJ, Beckman AM, et al. History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:19-24.

Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PWK. Aldehyde deshydrogenase Its role as a câncer stem cell marker comes down to the especific isoform. **Cell Cycle** 2011; 10:1378-84.

McDougal WS, Kirchner FK Jr, Edwards RH, Killion LT. Treatment of carcinoma of the penis: the case for primary lymphadenectomy. **J Urol** 1986; 136:38-41.

Maier S, Wilbertz T, Braun M, et al. SOX2 amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. **Hum Pathol** 2011; 42:1078-88.

Meijer RP, Boon TA, Van Venrooij GEP, Wijburg CJ. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. **Urology** 2007; 69:759-62.

Mohs FE, Snow SN, Larson PO. Mohs micrographic surgery for penile tumors. **Urol Clin North Am** 1992; 19:291-304.

Moreb J, Zucali JR, Zhang Y, Colvin MO, Gross MA. Role of aldehyde deshydrogenase in the protection of hematopoietic progenitor cells from 4-hydroperoxycyclophosphamide by interleukin 1 beta and tumor tumor necrosis factor. **Cancer Res** 1992; 52:1770-4.

Nagaraja V, Eslick GD. Forthcoming prognostic markers for esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. **J Gastrointest Oncol** 2014; 5:67-76.

Narasimharao KL, Chatterjee H, Veliath AJ. Penile carcinoma in the first decade of the life. **Br J Urol** 1985; 57:358.

Narayana AS, Olney LE, Loening SA, Weimar GW, Culp DA. Carcinoma of the penis: analysis of 219 cases. **Cancer** 1982; 49:2185-91.

Nelson BA, Cookson MS, Smith JA Jr, Chang SS. Complications of inguinal and pelvic lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis: a contemporary series. **J Urol** 2004; 172:494-7.

Odland PB. Organ-sparing dermatologic surgical approach to cancer of the penis. In: Raghavan D, Scher HI, Leibel AS, Lnge PH, editors. **Principles and practice of genitourinary oncology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.943-8.

Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. **Histopathology** 2011; 59:776-80.

Okudela K, Woo T, Mitsui H, et al. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas--its clinicopathologic and biological significance. **Int J Clin Exp Pathol** 2012; 6:1-12.

Ornellas AA, Seixas AL, de Moraes JR. Analyses of 200 lymphadenectomies in patients with penile carcinoma. **J Urol** 1991; 146:330-2.

Ornellas AA, Seixas AL, Marota A, Wisnesky A, Campos F, de Moraes JR. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. **J Urol** 1994; 151:1244-9.

Ozsahin M, Jichlinski P, Weber DC, et al. Treatment of penile carcinoma: to cut or not to cut? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 66:674-9.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J. **Cancer incidence in five continents. vol. VII.** Lyon: IARC; 1997. (IARC Scientific Publications; nº 143)

Paymaster JC, Gangadharan P. Cancer of the penis in India. **J Urol** 1967; 97:110-3.

Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging of penile carcinoma. **J Urol** 1980; 124:734-5.

Persky LE, Dekernion J. Carcinoma of the penis. **CA Cancer J Clin** 1986; 36:258-73.

Pinho MSL. Célula tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal. **Rev Bras Colo-Proctol** 2006; 29:120-4.

Pizzocaro G, Piva L, Bandieramonte G, Tana S. Up-to-date management of carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:5-15.

Pizzocaro G, Algaba F, Horenblas S, et al. European Association of Urology (EAU) Guidelines Group on Penile Cancer. EAU penile cancer guidelines 2009[J]. **Eur Urol** 2010; 57:1002-12.

Pompeo ACL, Koff W, Damião R, et al. **Carcinoma do pênis - Parte II.** Rio de Janeiro: Associação Médica Brasileira; 2006. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2ET07rD> > [2018 nov 22]

Pompeo ACL. **Linfadenectomia inguinal estagiada em câncer de pênis: avaliação prospectiva de 50 pacientes.** São Paulo; 1993. [Tese de Livre Docência-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Puras A, Gonzales-Flores B, Rodrigues R. Treatment of carcinoma of the penis. **Proc Kimbrough Urol Semin** 1978; 12:143-52.

Qiao B, He B, Cai J, Yang W. The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. **Int J Clin Exp Pathol** 2013; 7:28-37.

Rabinovich I, Sebastião APM, Lima RS, Urban CA, et al. Cancer stem cell markers ALDH1 and CD44+/CD24- phenotype and their prognosis impact in invasive ductal carcinoma. **Eur J Histochem** 2018; 62:2943.

Rahadiani N, Ikeda J, Mamat S, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. **Cancer Sci** 2011; 102:903-8.

Raju GC, Naraynsingh V, Venu PS. Carcinoma of the penis in the West Indies: a trinidad study. **Trop Geogr Med** 1985; 37:334-6.

Rizzino A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem Cells** 2013; 31:1033-9.

Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. **Mod Pathol** 2007; 20:474-81.

Rosemberg SK, Hennan G, Elfonte E. Sexually transmitted papillomaviral infection in male, VII Is cancer of penis sexually transmitted? **Urology** 1991; 37:437-40.

Rotolo JE, Lynch JM. Penile cancer: curable with early detection. **Hosp Pract** 1991; 26:131-8.

Santini R, Pietrobono S, Pandolfi S, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. **Oncogene** 2014; 33:4697-708.

Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DH, Crissman JD. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. **J Urol** 1992; 147:389-92.

Schellhammer PF, Jordan GH, Schlossberg SM. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED Jr, editors. **Campbell's urology**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1264-98.

Schuessler WW, Vancaillie TG, Reich H, Griffith DP. Transperitoneal endosurgical lymphadenectomy in patients with localized prostate cancer. **J Urol** 1991; 145:988-91.

Schwartz T, Stark A, Pang J, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 as a marker of mammary stem cells in benign and malignant breast lesions of Ghanaian women. **Cancer** 2012; 119:488-94.

Shabad AL. Some aspects of etiology and prevention of penile cancer. **J Urol** 1964; 92:696-702.

Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. **Semin Cancer Biol** 2010; 20:85-92.

Shindel AW, Mann MW, Lev RY, et al. Mohs micrographic surgery for penile cancer: management and long-term followup. **J Urol** 2007; 178:1980-5.

Silva MJCN. **Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio**. São Paulo; 2017. [Dissertação-Mestrado-Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo].

Skinner DG, Leadbetter WF, Kelley SB. The surgical management of squamous cell carcinoma of the penis. **J Urol** 1972; 107:273-7.

Slaton JW, Morgenstern N, Levy DA, et al. Tumor stage, vascular invasion and the percentage of poorly differentiated cancer: independent prognosticators for inguinal lymph node metastasis in penile squamous cancer. **J Urol** 2001; 165:1138-42.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. **TNM classification of malignant tumors**. 7<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009. Penile; p.239-42.

Solsona E, Iborra I, Ricós JV, et al. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. **Eur Urol** 1992; 22:115-8.

Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casnova JL, Ricós JV, Calabuig C. Prospective validation of the association of local tumor stage and grades as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal nodes. **J Urol** 2001; 165:1506-9.

Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF Jr. Penile cancer: relation of extent of metastasis to survival. **J Urol** 1987; 137:880-2.

Stankiewicz E, Kudahetti SC, Prowse DM, et al. HPV infection and immunochemical detection of cell-cycle markers in verrucous carcinoma of the penis. **Mod Pathol** 2009; 22:1160-8.

Staubitz WJ, Lent MH, Oberkircher OJ. Carcinoma of the penis. **Cancer** 1955; 8:371-8.

Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. **Mamm Genome** 1994; 5:640-2.

Sufrin G, Huben R, editors. Adult and pediatric urology. 2<sup>nd</sup> ed. Chicago: Year Book Medical; 1987. Benignant and malignant lesions of the penis; p.1462-3.

Su Y, Qiu Q, Zhang X, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2010; 19:327-37.

Sun C, Sun L, Li Y, Kang X, Zhang S, Liu Y. Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. **Med Oncol** 2013; 30:503.

Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. **J Urol** 2005; 174:923-7, discussion 927.

Tan EY, Thike AA, Breast Surgical Team at Outram, Tan PH. ALDH1 expression is enriched in breast cancers arising in young women but does not predict outcome. **Br J Cancer** 2013; 109:109-13.

Tang XB, Shen XH, Li L, Zhang YF, Chen GQ. SOX2 overexpression correlates with poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx** 2013; 40:481-6.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell** 2006; 126:663-76.

Tanis PJ, Lont AP, Meinhardt W, Valdés Olmos RA, Nieweg OE, Horemblas S. Dynamic sentinel node biopsy for penile cancer: reliability of a staging technique. **J Urol** 2002; 168:76-80.

Tewari M, Kumar M, Shukla HS. Nd: Yag laser treatment of early stage carcinoma of the penis preserves form and function of penis. **Asian J Surg** 2007; 30:126-30.

Tietjen DN, Malek RS. Laser therapy of squamous cell dysplasia and carcinoma of the penis. **Urology** 1998; 52:559-65.

Tobias-Machado M, Tavares A, Ornellas AA, Molina WR, Jr, Juliano RV, Wroclawski ER. Video endoscopic inguinal lymphadenectomy (VEIL): a new minimally invasive procedure for radical inguinal nodes management in penile cancer patients. **J Urol** 2007; 177:953-7; discussion 958.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1 A1 in stem cells and cancer. **Oncotarget** 2016; 10:11018-32.

Torbrand C, Wigertz A, Drevin L. et al. Socioeconomic factors and penile cancer risk and mortality; a population-based study. **BJU Int** 2017; 119: 254-60.

Tsen HF, Morgenstern H, Mack T, Peters RK. Risk factors for penile cancer: results of a populationbased case-control study in Los Angeles County (United States). **Cancer Causes Control** 2001; 12:267-77.

van Howe RS, Hodges FM. The carcinogenicity of smegma: debunking a myth. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2006; 20:1046-54.

Vapnek JM, Hricak H, Carrol PR. Recent advances in imaging studies for tagging of penile and urethral carcinoma. **Urol Clin North Am** 1992; 19:257-66.

Varma VA, Sanchez-Lanier M, Unger ER, et al. Association of human papillomavirus with penile carcinoma: a study using polymerase chain reaction and in situ hybridization. **Hum Pathol** 1991; 22:908-13.

Vatanasapt V, Martin N, Sriplung MH, et al. Cancer incidence in Thailand 1988-1991. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1995; 4:475-83.

Velcheti V, Schalper K, Yao X, et al. High SOX2 levels predict better outcome in non-small cell lung carcinomas. **PLoS One** 2013; 8:e61427.

Villa LL, Lopes A. Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. **Int J Cancer** 1986; 37:853-5.

Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, Chéchile G, Algaba F, Palou J. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. **Eur Urol** 1997; 32:442-7.

Vogler T, Kriegl L, Horst D, et al. The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors. **Exp Mol Pathol** 2012; 92:111-7.

Wang K, Chen X, Zhan Y, Jiang W, Liu X, Wang X, Wu B. Increased expression of ALDH1A1 protein is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **Med Oncol** 2013; 30:574.

Wang Y, Zhe H, Gao P, Zhang N, Li G, Qin J. Cancer stem cell marker ALDH1 expression is associated with lymph node metastasis and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma: a study from high incidence area of northern China. **Dis Esophagus** 2012; 25:560-5.

Wajsman Z, Moore RH, Merrin CE, Murphy GP. Surgical treatment of penile cancer: a follow-up report. **Cancer** 1977; 40:1697-701.

Wesper E, Simon J, Schulman CC. Cabaña approach: is sentinel node biopsy realiable for staging penile carcinoma? **Urology** 1986; 28:278-9.

Wiener JS, Effert PJ, Humphrey PA, YU L, Liu ET, Walther PJ. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in squamous-cell carcinoma of the penis: a restropective analysis of primary and metastatic lesions by differential polymerase chain reation. **Int J Cancer** 1992; 50:694-701.

Wu A, Luo W, Zhang Q, et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett** 2013; 330:181-9.

Wu Q, Shi H, Holm R, et al. Aldehyde dehydrogenase-1 predicts favorable prognosis in patients with vulvar squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2014; 34:859-65.

Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. **Oncotarget** 2017; 8:44917-43.

Yang F, Gao Y, Geng J, Qu D, Han Q, Qi J, Chen G. Elevated expression of SOX2 and FGFR1 in correlation with poor prognosis in patients with small cell lung cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2013; 6:2846-54.

Yang L, Xu JF, Kang Q, et al. Predictive value of stemness factor Sox2 in gastric cancer is associated with tumor location and stage. **PLoS One** 2017; 12:e0169124.

Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z. The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. **Med Sci Monit** 2011; 17:HY21-26.

Yoshida A, Dave V, Han H, Scanlon KJ. Enhanced transcription of the cytosolic ALDH gene in cyclophosphamide resistant human carcinoma cells. **Adv Exp Biol** 1993; 328:63-72.

Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study. **Histopathology** 2011; 58:608-16.

Young MJ, Reda DJ, Waters WB. Penile carcinoma: a twenty-five-year experience. **Urology** 1991; 38:529-32.

Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. **Oral Oncol** 2012; 48:1-9.

Zhou JH, Hanna EY, Roberts D, Weber RS, Bell D. ALDH1 immunohistochemical expression and its significance in salivary adenoid cystic carcinoma. **Head Neck** 2012; 35:575-8.

Zhou L, Luo Y, Li K, Tian L, Wang M, Li C, Huang Q. Molecular markers of therapeutic resistance in breast cancer. **Hum Pathol** 2013; 44:1421-8.

Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, et al. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. **BJU Int** 2007; 100:204;

Zhu Y, Ye DW, Yao XD, et al. The value of squamous cell carcinoma antigen in the prognostic evaluation, treatment monitoring and followup of patients with penile cancer. **J Urol** 2008; 180:2019.

Zhu Y, Ye DW. Lymph node metastases and prognosis in penile cancer. **Chin J Cancer Res** 2012; 24:90-6.

## Anexo 1 - Classificação histológica

<b>I) Tumores malignos epiteliais de pênis</b>
Carcinoma espinocelular
Carcinoma basalóide
Carcinoma Warty (condilomatoso)
Carcinoma verrucoso
Carcinoma papilífero, não especificado de outra forma
Carcinoma sarcomatoso
Carcinoma misto
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma de células de Merkel
Carcinoma de pequenas células do tipo neuroendócrino
Carcinoma sebáceo
Carcinoma de células claras
Carcinoma de células basais
<b>II) Lesões precursoras</b>
Neoplasia intraepitelial grau III
Doença de Bowen
Eritroplasia de Queyrat
Doença de Paget
<b>III) Tumores melanocíticos</b>
Nevo melanocítico
Melanoma
<b>IV) Tumores Mesenquimais</b>
<b>V) Tumores hematopoiéticos</b>
<b>VI) Tumores secundários</b>

Fonte: OMS (2004)

## Anexo 2 – Classificação carcinoma peniano relacionado ao HPV

CEC penianos não relacionados com o HPV	CEC peniano relacionado com o HPV
1. Carcinoma espinocelular	7. Carcinoma basaloide
1a. Carcinoma habitual	7a. Carcinoma papilar-basaloide
1b. Carcinoma pseudo-hiperplásico	8. Carcinoma “wartý”
1c. Carcinoma pseudoglandular	8a. Carcinoma “wartý”–basaloide
2. Carcinoma verrucoso	8b. Carcinoma de células claras
2a. Carcinoma verrucoso puro	9. Carcinoma semelhante a linfoepitelioma
2b. Carcinoma cuniculatum	
3. Carcinoma papilar	
4. Carcinoma adenoescamoso	
5. Carcinoma escamoso sarcomatoide	
6. Carcinoma misto	

Fonte: OMS (2018)

### Anexo 3 - Ficha de Levantamento de Dados

**Nº. do Array** - \_\_\_\_\_

**Nº. do AP** - \_\_\_\_\_

**RG** \_\_\_\_\_

**Revisto :** (m)microfilme (p) prontuário

**Data da Admissão** \_\_\_\_\_

**Idade a Admissão (anos)** \_\_\_\_\_

**Estado Civil:** (1) Solteiro (2) Casado (3) Separado (4) outros (9) Ign

**Raça :** (1) Branca (2) Amarela (3) Negro (9) Ign

**Sinais / Sintomas :** (1) Ferida (2) Dor (3) Inflamação (4) Disúria   
 (5) Prurido (6) Outros (9) Ign.

**Tempo de Evolução (meses) :** se ignorado 999

**Antecedentes venéreos:** (0) Não (1) Sim (9)Ign

**Postectomia:** (0) Não (1) Não relacionada (2)Relacionada (9) Ign

**Situação a 1ª consulta :** (1) Biopsiado (2) Amputado (3) Esvaziado   
 (4)Intacto (9) Ign

**Estadiamento cT:** (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx

**Estadiamento cN:** (0) N0 (1)N1 (2)N2 (3)N3 (9)Nx

**Estadiamento cM:** (0) M0 (1)M1 (9)Mx

**Data da amputação / ressecção** \_\_\_\_\_

**Data do anatomo-patológico** \_\_\_\_\_

**Cirurgia:** (1) Amp. Parcial (2) Amp. Total (3) Exérese   
 (4) Postectomia (5) AIIA – Inter-íleoabdominal (6)Emasculação

**Complicações relacionadas a cirurgia:** (0) Não (1) Infecção   
 (2) Deiscência (3) Estenose (4) hemorragia (9) Ign

**Data do esvaziamento:** \_\_\_\_\_

**Tipo esvaziamento ganglionar:** (0) Não (1) Inguinal (2) Inguino-iliaco (9) Ign

**Intenção do esvaziamento :** (1) Principio (2) necessidade (8) ã aplica (9) Ign

**Lateralidade do esvaziamento :** (1) Unilateral (2) bilateral (8) ã aplica (9) Ign

**Complicações relacionadas esvaziamento:** (0)Não (1)Infecção (2) Deiscência   
 (3) hematoma (4) necrose (5) linfedema (6)Ruptura vasos (8) ã aplica (9) Ign

**Total de Linfonodos examinados:**

**Total de Linfonodos positivos:**

**Lateralidade linfonodos positivos:** (1)Unilat. (2)Bilateral (8) ã aplica (9) Ign

**Cadeia Positiva:**(1)Inguinal (2)Inguinal+Ilíaco (3)Iliaco (8) ã aplica(9)Ign

**Histologia:** (1) CEC (2) warty (3) papilar (4) giant condiloma (5) sarcomatoide   
 (6) sendo glandular (7) cuniculatum (8) basaloide (9) other (10) verrucoso  
 (11) warty – basaloide (12) uretra (13) pseudo hiperplasia (14) adeno – esquamoso  
 (15) mixed (16) anaplásico (17) Verrucoso Invasivo (18) Warty invasivo

**Bordas :** (1) Regulares (2) Irregulares (8) Não avaliável

**Grau(Cubilla):** (1) baixo grau (2) intermediário (3) alto grau (8) não avaliável

**Local anatômico-AP:** (1) LP (2) CS (3) CC (4) DT (5) SK (6) A1B (8) não aplica

**Corpo esponjoso-AP:** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável

**Corpo cavernoso-AP:** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável

**Uretra-AP:** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável

**Invasão vascular-AP:** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável

**Invasão perineural-AP:** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliável

**Thickness-AP (mm):**

**Index-** 1/2/3/4/5/6 e 8 não avaliável

**Infiltração de órgãos adjacentes:** (0)Não (1)Presente (9)Ign

**Alteração sugestiva de HPV (coilocitose):** (1)Presente (2)Ausente (9) Ign

**Data da recidiva:** \_/\_/\_

**Local da recidiva:** (0)Não (1)Coto (2)Regional (3)pulmões (4)Ossos   
 (5) Fígado (6)outros (9)Ign.

**Tratamento da recorrência;** (1)Não (2)amputação (3)linfadenectomia (4)Rxt   
 (5)Qt (6)outros (7)cirurgia meta (8) ã aplica (9)Ign.

**Data do último seguimento:**

**Situação no seguimento:** (1)Vivo s/ doença (2)Vivo com doença   
 (3)Óbito por Cancer (4)Óbito por outra causa (5) perdido de vista

**Hiperplasia escamosa (Hiperesc) :** (0) não tem (1) tem (8)não avaliado

**Tipo Hiperplasia escamosa (Thiperesc):** (0) flat (1) papilar   
 (2) pseudoepiteliomatosa (3) verrucosa (4) outras (8) não avaliado

**SIL:** (0) não tem (1) baixo grau (2) alto grau (8) não avaliado

**Tipo de SIL (Tsil):** (0) warty (1) escamoso (2) basalóide   
 (3) warty-basalóide (8) não avaliado

**Líquen Escleroso (LS):** (0) negativo (1) positivo (8) não avaliado

**Tipo de Líquen Escleroso (TLS):** (0) típico (1) atípico (8) não avaliado

**Uretral:** (0) sil negativo (1) sil positivo (8)não avaliado

**Localização (macroscopia) :** (1) glande (2) prepúcio(3) sulco bálano – prepucial   
 (4) corpo (5) uretra (6) tumor multicêntrico (7) escroto (8) Não avaliável  
 (9) recidiva inguinal – interílio (10) tu em coto recidiva

**Invasão (macroscopia):** (0)não tem (1) corpo esponjoso (2) corpo cavernoso   
 (3) uretra (4) osso (5) raiz pênis (6) pele (7)escroto (8)Não avaliável

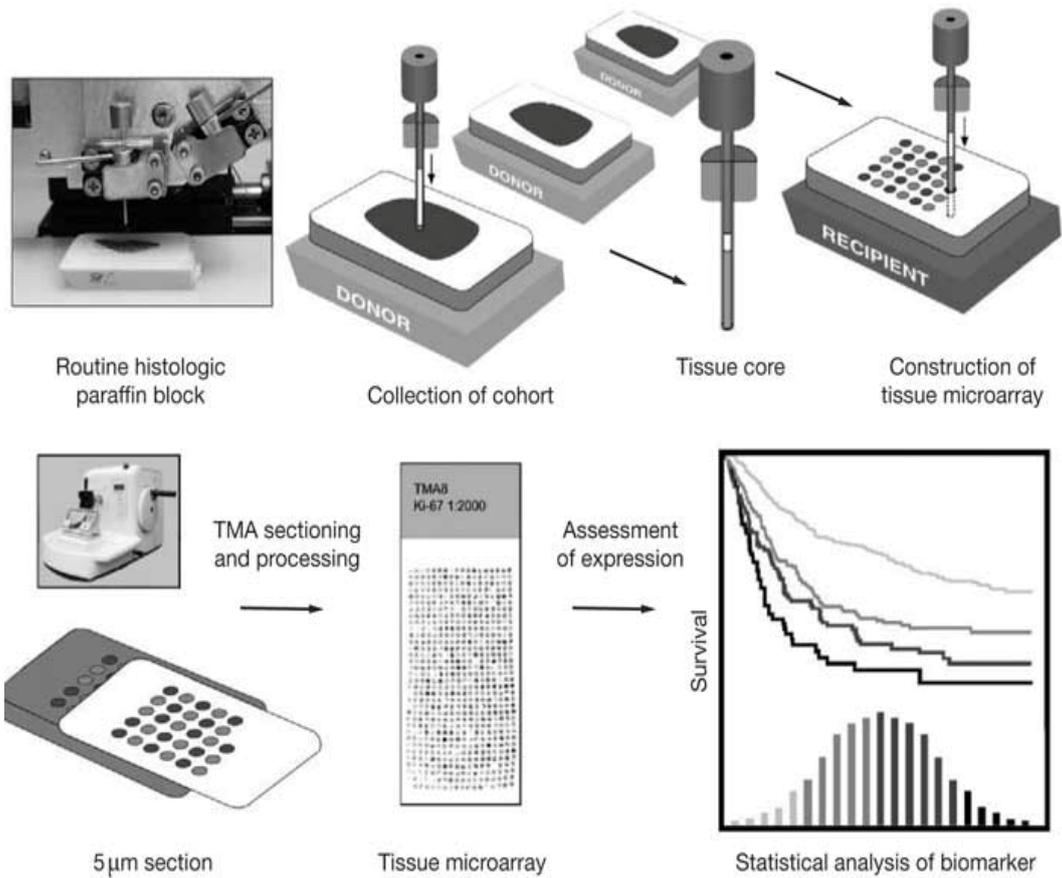
**Tamanho do pênis (cm)**

**Tamanho do Tumor (cm)**

**Margem (cm)**

**Margem: (0) negativa (1) positiva (8) não avaliável**

## Anexo 4 - Construção de TMA



Giltane JM, Rimm DL. Construction and use of tissue microarrays for biomarker identification. **Nat Clin Practice Oncol** 2004; 1:104-11.

**Anexo 5 - Carta Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 11 de outubro de 2013.

Ao  
**Dr. Gustavo Cardoso Guimarães.**

**Aluno: Luiz Renato Montez Guidoni (Doutorado).**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1793/13**

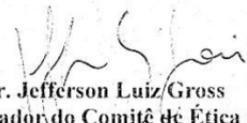
**“Estudo da expressão imunohistoquímica de SOX2 e ALDH1 como biomarcadores em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de pênis”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 03/09/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 18/06/2013, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 07 de agosto de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica - Núcleo de Urologia;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patologia;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**